

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Untersuchungen über den biologischen

Nachweis von Adiuretin

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten

Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Werner Hubrich

Prag

München 1972



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med.H.Lydtin
 Prof.Dr.med.W.Seitz
Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.K.Thurau
Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 1973

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung	3
1. Ursprung, chemische Struktur und Wirkungs- mechanismen des ADH	3
2. Chemische Nachweisverfahren	5
3. Immunologische Nachweisverfahren	5
4. Biologische Nachweismethoden	6
a) Historische Entwicklung der biologischen Nachweismethoden	7
b) Prinzipielle Anlage der modernen biologischen Nachweisverfahren	9
c) Weiterentwicklung des Grundprinzips biolo- gischer Nachweisverfahren (Hydrierung, Re- gistrierung und operative Verfahren	10
d) Wahl der geeigneten Tiere	13
5. Einführung in das Untersuchungsvorhaben	14
II. Methodik	18
III. Ergebnisse	23
1. Erfolgsquote der Präparationen	23
2. Beschreibung der Versuchsverläufe	23
a) Einfluß der Vorbehandlung	23
b) Urinleitfähigkeit	24
c) Zeitpunkt des Eintritts antidiuretischer Effekte nach ADH-Verabreichung	25
d) Reaktionsmöglichkeiten nach ADH-Verab- reichung	26
e) Dosiswirkungsrelation antidiuretisch wirk- samer ADH-Injektionen	27
3. Fehlersuche	28
a) Einfluß der Aufbewahrung von ADH-Lösungen auf ihre Aktivität	28
b) Einfluß intragastraler Alkoholgaben	29
c) Effekt der Placebogaben	29
d) Effekt der Schwanzvenenkanülierung auf die Rattenpräparationen	30
4. Ergebnisse der Vorversuchsreihe	30

	Seite
IV. Diskussion	33
1. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	33
2. Einfluß der Vorbehandlung und Auswahl der Tiere auf die Ergebnisse	34
3. Kalorienverlust als mögliche Ursache einer unspezifischen Vasopressininkretion	35
4. Wahl der Applikationsart der Dauerinfusion und ihr Einfluß auf das Harnzeitvolumen	37
5. Verringerung des Operationstraumas zur Aus- schaltung unspezifischer ADH-Sekretion	38
6. Analyse der Ursachen der Widersprüche im Schrifttum	40
V. Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	43

I. Einleitung

1.) Ursprung, chemische Struktur und Wirkungsmechanismen des antidiuretischen Hormons.

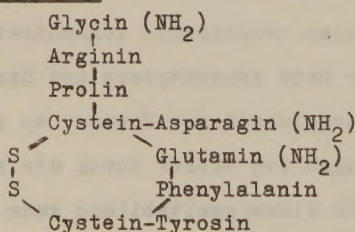
Das Leben höherer Tiere auf dem Land setzt die Entwicklung von wassererhaltenden Mechanismen voraus, da Wasser nicht im Überfluß zur Verfügung steht und eingespart werden muß, wenn unter den Bedingungen des Wassermangels homöostatische Verhältnisse erhalten werden sollen. Wichtiges Stellglied der Osmo- und Volumenregulation ist beim Säugetier die Niere, deren Tubulus - und Sammelroherepithel unter dem Einfluß des antidiuretischen Hormons für Wasser durchlässiger wird. Durch Reabsorption von Wasser wird entsprechend der hohen osmotischen Konzentration des Niereninterstitiums der Harn konzentriert und damit Wasser eingespart. Fehlt das antidiuretische Hormon, so verliert der Organismus große Mengen von Wasser durch die resultierende Harnflut und die Flüssigkeitsbilanz kann nur über den Durstreflex durch erhöhte Wasserzufuhr ausgeglichen werden.

Auf Zusammenhänge zwischen dem hiermit angesprochenen "Diabetes insipidus" und dem Hypophysenhinterlappen wies bereits FRANK um die Jahrhundertwende hin. VON DEN VELDEN erkannte die diuresehemmende Wirkung von Hinterlappenextrakten. Diese üben vier verschiedene Wirkungen aus: Kontraktion der glatten Uterusmuskulatur, Milchejektion durch Kontraktion der glatten Muskulatur der Brustdrüse, Hyper-

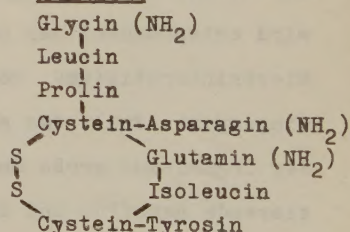
tension durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und Antidiurese. Da die antidiuretische Wirkung auch an einer denervierten Niere nachweisbar war, vermutete VERNEY schon 1925, daß es sich bei den untersuchten Extrakten um "Hormone" handeln könnte. Dabei war völlig ungeklärt, ob im Hypophysenhinterlappen mehrere Hormone mit unterschiedlichen Wirkungen oder ein Hormon, dem alle Partialfunktionen zugesprochen werden konnten, gebildet wurden.

1928 gelang es KAMM und ALDRICH mit Hilfe verschiedener Fällungsverfahren das antidiuretische Prinzip vollständig vom uteruswirksamen Oxytocin zu trennen. Bei der biologischen Prüfung der Extrakte stieg die antidiuretische Wirkung parallel mit dem blutdrucksteigernden Effekt an, weshalb schon damals angenommen wurde, daß Vasopressin mit Adiuretin identisch sei. Diese Auffassung wurde endgültig 1953 von du VIGNAUD et al. bestätigt. Ihnen gelang die Strukturaufklärung und synthetische Darstellung von Vasopressin und Oxytocin.

Arginin-Vasopressin:



Oxytocin



Das antidiuretische Hormon der meisten Säugetiere und des Menschen ist ein cyclisches Oktapeptid, das mit dem Oxytocin den grundsätzlichen Bauplan hinsichtlich Aminosäuresequenz und Ringstruktur gemeinsam hat. Lediglich 2 Aminosäuren im Oxytocin, nämlich Isoleucin und Leucin, sind im Vasopressin durch Phenylalanin und Arginin (bei

Schwein und Nilpferd durch Lysin) ersetzt. Die Ähnlichkeit in der Zusammensetzung dieser Moleküle erklärt die Schwierigkeiten, die einer Trennung der Hormone entgegenstanden. Das Oxytocin hat, wie bei der nahen chemischen Verwandtschaft zu erwarten, auch vasopressorische und Vasopressin uteruskontrahierende Wirkung.

Zur Aufklärung der biologischen Bedeutung des anti-diuretischen Hormons im Wasserhaushalt war es nötig, eine quantitative Nachweismethode für Adiuretin (ADH) zu entwickeln, um die Plasmakonzentration des Hormons bestimmen zu können.

2.) Chemische Nachweisverfahren

Nach den Untersuchungen von KAMM und ALDRICH lassen sich Hinterlappenhormone mittels Essigsäure extrahieren, sind in Eisessig löslich und können mit organischen Lösungsmitteln (Petroläther, Äther, Aceton) gefällt werden. Im Prinzip werden diese Eigenschaften in Kombination mit einer Absorptionschromatographie verwandt, um den Wirkstoff aus Plasma oder Urin zu gewinnen (TAUBERT). Damit das Konzentrat quantitativ erfaßt werden kann, werden jedoch große Mengen des Plasmas benötigt. Auch die Einführung der Papierchromatographie (HELLER u. LEDERIS, ARIMURA und DINGMAN) hat daran nichts geändert, nachweisbar waren lediglich Mengen, die weit über den physiologisch vorkommenden Plasmaspiegeln lagen.

3.) Immunologischer Nachweis

PERLMUTT und Mitarbeiter entwickelten eine radioimmuno-

logische Nachweismethode von Lysin - Vasopressin, wobei Kaninchen gegen an Rinderserum konjugiertes Vasopressin immunisiert wurden. Die damit gewonnenen Antikörper wurden nach Markierung mit J 131 zu einer quantitativen Praecipitation verwendet. Das Zuführen zunehmender Mengen von dem zu bestimmenden Lysin-Vasopressin zum Antigen-Antikörpersystem führte zu einer proportionalen Abnahme der praecipitierten Menge des markierten Lysin-Vasopressin. Damit konnten zwar hohe Forderungen an die Genauigkeit und Spezifität der Nachweismethodik verwirklicht werden, für weitere Untersuchungen erscheint die Methodik jedoch zu aufwendig, zumal die Empfindlichkeit unter der einfacheren Versuchsanordnungen liegt. In Kombination mit einem Anreicherungsverfahren könnten hiermit jedoch Plasmaspiegelbestimmungen des antidiuretischen Hormons möglich werden.

4.) Biologische Nachweismethoden

Als weitere Nachweismöglichkeiten bietet sich die biologische Wirkung des antidiuretischen Hormons an. Dazu kann zunächst einmal die vasopressorische Aktivität des Hormons verwendet werden. Diese wird am Blutdruck von narkotisierten Katzen oder Ratten nach Vorbehandlung mit adrenergen Blockern bestimmt (STÜRMER). Obwohl es sich dabei um einen einfachen, schnellen und sensiblen Assay handelt, reicht die Empfindlichkeit nicht aus, um den Nachweisbereich auf physiologisch zirkulierende Mengen auszudehnen.

Da die antidiuretische Aktivität schon in 1/1000 der blutdruckwirksamen Dosen des Hinterlappenhormons nachweisbar ist, wurden zahlreiche Methoden zur Messung der antidiuretischen Aktivität von Hypophysenhinterlappenextrakten oder gereinigter Adiuretinpräparate beschrieben.

Dabei wird die antidiuretische Wirkung eines Testmaterials mit der einer bekannten Menge von internationalem Hypophysenhinterlappenstandard (0,5 mg des Extraktes aus dem Hypophysenhinterlappen des Rindes entsprechen einer internationalen Einheit (i.E.) von Vasopressin) oder eines Adiuretinpräparates verglichen.

a) Historische Entwicklung der biologischen Nachweismethoden:

Das Prinzip einer Diuresehemmung wasserbelasteter Versuchstiere durch antidiuretisches Hormon geht auf BURN zurück. Die Wasserbelastung ist zur Ausschaltung einer endogenen Adiuretinsekretion notwendig, die den antidiuretischen Effekt der Testsubstanzen weniger leicht erkennbar machen und die Empfindlichkeit abschwächen würde. Zum anderen wird ein wasserretinierender Effekt bei maximaler Diurese deutlicher als unter Normalverhältnissen.

BURN beschrieb als erster den Test an Ratten und verglich die Urinausscheidung eines Rattenkollektivs nach Wasserbelastung vor und nach subkutaner Verabreichung von Hypophysenhinterlappenextrakt. Durch Vergleich der wasserretinierenden Wirkung dieser Extrakte mit Internationalem Hypophysenhinterlappen-Standard konnte er deren Wirkstoffgehalt ungefähr bestimmen. Eine annähernd lineare Dosiswirkungsrelation wurde erreicht.

In der Folgezeit wurden zahlreiche neue Methoden entwickelt. Als Testobjekte dienten gesunde und hypophysektomierte Hunde, Kaninchen und Ratten. Das Testmaterial wurde sowohl intraperitoneal, als auch subkutan und intravenös injiziert (Literaturzusammenfassung bei STEIN). Die antidiuretische Wirkung wurde in Änderungen der Urinausscheidung (BURN, JEFFES, AMES, STEIN, DICKER), Chlorid- oder Wasserkonzentration (d.h. das Verhältnis von Wasser zu den gesamten osmotisch wirksamen Teilchen) ausgedrückt.

Bei subkutaner Verabreichung der Testsubstanzen wird eine neurohypophysär bedingte Antidiurese vorgetäuscht (AMES, GINSBERG und HELLER).

Unnatürliche Abbaumechanismen sowie Schmerzreize könnten diese unspezifischen Reaktionen auslösen. Psychische Reize wie Angst und Aufregung führen ebenfalls zu vermehrter ADH-Sekretion (WAKIM). Andererseits ist der Plasmaspiegel des antidiuretischen Hormons auch nach Verabreichung verschiedener Pharmaka wie Nikotin, Äther, Morphin und Barbituraten erhöht (WAKIM).

Eine einfache Versuchsanordnung beschrieben STEIN und Mitarbeiter. Sie basierte auf der Beobachtung, daß nach zweimaliger intragastraler Verabreichung 0,2iger NaCl-Lösung die Urinausscheidung während 60 min. linear verläuft. Durch intraperitoneale Injektion verschiedener Adiuretinkonzentrationen wurde die Urinausscheidung während der 60 Minutenperiode dosiswirkungsabhängig vermindert. Durch wiederholte Verwendung der gleichen Ratten war die Methode sehr ökonomisch, der Plasmaspiegel des antidiuretischen Hormons wurde jedoch viel zu hoch angegeben (0,1 - 0,5 mE/ml). Die intraperitoneale Verabreichung per se führt jedoch schon zu unspezifisch erhöhten Plasmaspiegeln an Adiuretin, die die Konzentration nach intravenöser Verabreichung um das 25 fache übersteigen (AMES, SCHRÖDER und ROTT). Die Ungenauigkeit des Nachweises nach intraperitonealer Injektion des Testmaterials wurde von DICKER aufgezeigt, damit erwies sich die intravenöse Applikation als notwendig.

Als Testobjekt des Adiuretinnachweises hatte sich die Ratte ganz allgemein durchgesetzt, als BUCHBORN eine Einschränkung ihrer Brauchbarkeit als Versuchstier mit einer Unspezifität der Diuresehemmung begründete, da auch andere im Harn oder Plasma enthaltene Substanzen eine Antidiurese hervorrufen können. Als weitere Fehlerquelle wurde die leichte Erregbarkeit der Ratten angeführt, die zu unspezifischer Adiuretinssekretion führen könnte. Die Nachweismethode an der Erdkröte wurde als hochspezifisch für antidiuretisches Hormon angegeben, da andere Substanzen wie Oxytocin, Serotonin und Ferritin keine Wasserretention verursachten. Eine Modifikation steigerte die Empfindlichkeit der Buchborn'schen Methode (KAUTZ, LAUBER). Doch wurden auch diese Befunde bald in Frage gestellt, da die Injektionen der Testlösung in den dorsalen Lymphsack auch unspezifische, wasserretinierende Reaktionen auslöste (SCHRÖDER und ROTT, IRMSCHER, VORHERR und FRIEDBERG). Die mit dieser Methodik gefundenen Plasmaspiegel an Adiuretin wurden somit sehr hoch angegeben (10 - 50 uE/ml Plasma), es wurde deshalb auch weiterhin die Ratte als Versuchstier verwandt.

b) Prinzipielle Anlage der modernen biologischen Nachweisverfahren:

JEFFERS et al. führten die intravenöse Injektion des Testmaterials ein. Ihre Nachweismethode wird in ihren Grundzügen auch heute noch verwandt. Durch Alkoholsedierung der Versuchstiere gelang es, die Empfindlichkeit des biologischen Nachweises erheblich zu steigern. Alkohol hemmt die endogene Adiuretinfreisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen (AMES, DICKER, GAUER). Eine in Narkose durchgeführte Zystostomie mit Ligatur der Urethra ermöglichte eine direkte Messung des Harnzeitvolumens. Dadurch wurden auch minimale Änderungen des Harnflusses registrierbar. Das Testmaterial wurde in die Femoralvene injiziert und die Urinportionen bei dem klassischen Ansatz von JEFFERS et al. in 4 min. Portionen gemessen. Eine gleichmäßige Diurese erhielten BOURA und DICKER durch Einstellung der Flüssigkeitszufuhr auf die Urinausscheidung über einen sog. feed-back-Mechanismus. Die Ratten lagen auf einer empfindlichen Waage, die eine Infusionspumpe steuerte. Die Autoren führten die hohe Empfindlichkeit ihres Nachweisverfahrens auf die Konstanthaltung des Gewichtes, die ein gleichmäßiges Verteilungsvolumen der Testsubstanzen wahrscheinlich machte, zurück. Die Autoren beschrieben eine lineare Beziehung zwischen antidiuretischem Effekt und logarithmisch aufgetragenen Dosen von antidiuretischem Hormon.

c) Weiterentwicklung des Grundprinzips der biologischen
Nachweisverfahren:

Um eine hohe und gleichmäßigere Diurese zu erhalten, wurde die Vorhydrierung der Tiere am Tag vor dem Versuch eingeführt (BLACKMORE, CHESTER). Durch Abbinden der Blase über einen Katheter gelang es, den Blasentotraum zu vermindern (THORN 1957). Dadurch wurden durch Blasentonusänderungen verursachte Diureseschwankungen ausgeschaltet. Da die Dichte des Urins bei gleichmäßiger Hydrierung eine bessere Konstanz als das Harnvolumen aufweisen sollte (THORN), wurde ihr Anstieg nach Adiuretinverabreichung als Wirkungsindex eingeführt. Ob die Dichte als Parameter der osmolaren Konzentration, noch dazu bei hohen Alkoholkonzentrationen im Urin, geeignet war, schien jedoch fraglich (SAWYER 1958).

Durch Aufzeichnung der Diurese mittels eines elektrischen Tropfenzählers auf ein Kymogramm wurde es möglich, auch kurzfristige Abnahmen des Harnzeitvolumens zu messen (VORHERR, SCHRÖDER). SCHRÖDER und ROTT, sowie VORHERR und FRIEDBERG konnten hiermit bei einer unteren Empfindlichkeitsgrenze von 5-10 uE Arginin Vasopressin weder im Plasma noch im Serum von Normalpersonen antidiuretische Substanzen nachweisen. Der physiologische Vasopressinspiegel sollte deshalb unter 10 uE/ml Plasma liegen. Ein Nachweisverfahren mit einer entsprechend hohen Empfindlichkeit war bis dahin noch nicht bekannt.

Die erheblichen methodischen Schwierigkeiten des Bioassays mit Nativplasma veranlaßten die Ausarbeitung eines Anreicherungsverfahrens (WEINSTEIN, YOSHIDA). Die Plasmaextrakte liefen dabei über eine mit Harn XE 64 beschickte Säule, das antidiuretische Hormon wurde dann mit 50 %iger Essigsäure eluiert. Das Konzentrat wurde anschließend mit der biologischen Methodik getestet (YOSHIDA, SHARE, AHMED). Mit dieser Methode waren bei Normalpersonen ungefähr 6 uE/ml Plasma nachzuweisen, für Untersuchungen in größerem Maßstab schien dieses Verfahren jedoch zu aufwendig zu sein. Zudem addierte sich zur Ungenauigkeit des Bioassays die Unsicherheit der vollständigen Extraktion.

Chirurgische Eingriffe stimulieren die Adiuretin-Sekretion (EISEN, MORAN). Durch Anlegen einer Blasen-fistel 5 Tage vor dem Versuch wurde die Traumatisierung am Versuchstag vermindert (HELLER). Die Testsubstanz wurde über die Schwanzvene appliziert.

Narkose und Hydrierung wurden über einen Magenschlauch konstant gehalten. Die untere Empfindlichkeitsgrenze dieser Methode lag bei 0,62 uE, die Plasmakonzentration eines normal hydrierten Menschen wurde damit auf durchschnittlich 1,67 uE/ml Plasma geschätzt. In einer Modifikation dieser Anordnung - die Hydrierung wurde mit intravenöser Dauerinfusion aufrecht erhalten - dehnten CZACZKES und Mitarbeiter den Nachweisbereich auf 0,25 uE aus. Größenordnungsmäßig entsprach die Höhe des Plasmaspiegels der von HELLER und STULC. JONES und LEE fanden bei Benützung der voroperierten Ratte keine Sensibilitätssteigerung des Nachweises.

Die ADH-Wirkung ist vom NaCl-Haushalt abhängig. Die Infusion isotoner NaCl-Lösungen setzt den antidiuretischen Effekt stark herab, bei Belastung mit 2,5 %iger NaCl-Lösung kommt es nach Verabreichung von antidiuretischem Hormon ausschließlich zu einem diuretischen Effekt (WITTE).

Mit zunehmender Harnnatriumkonzentration wird die Größe der Antidiurese nach antidiuretischem Hormon geringer, um schließlich in einen Diureseanstieg überzugehen.

SCHRÖDER und NIETMANN deuteten dies als ein "Überfahren" des tubulären, adiuretinabhängigen Konzentrationsmechanismus durch Erhöhung der Natriumkonzentration der in diese Abschnitte einfließenden Flüssigkeit. Die Hydrierung der Ratten mit hypotonen NaCl-Lösungen ermöglichte eine Steigerung des antidiuretischen Effektes. Die Sensibilität des Nachweises wurde hiermit vergrößert (CZACZKES, HEINTZ, GAUER).

Bei peroraler Wässerung der Ratten während des Versuches müßte eine regelmäßige Resorption der zugeführten Flüssigkeit vorausgesetzt werden, um Extrazellulärvolumen und Plasmaosmolarität konstant zu halten. Zusätzlich induziert die Alkoholbelastung eine Magensaftsekretion mit folgender Verminderung des Extrazellulärtraumes (NITSCHKE). NITSCHKE und Mitarbeiter fanden bei Sektionen einiger Versuchstiere große Flüssigkeitsvolumina im Magen-Darm-Trakt. Bei intravenöser Hydrierung der Tiere sollten diese Störfaktoren ausgeschaltet, eine gleichmäßigere Diurese die Folge sein.

Da der Wasserverlust bei Ratten durch Faeces und Perspiratio insensibilis das Fünffache des Urinvolumens betragen soll, erzeugten GAUER und TATA 50% -80 %ige Luftfeuchtigkeit im Labor, der Flüssigkeitsverlust als Stimulus einer Adiuretin-Sekretion sollte dadurch vermindert werden.

HEINTZ und Mitarbeiter leiteten den ausgeschiedenen Harn in Anlehnung der Methodik an BERDE und Mitarbeiter über zwei mit 50% Alkohol gefüllte Woulf'sche Flaschen. Die Urintropfen konnten somit in mehrere kleine fraktioniert werden (da Alkohol eine geringere Oberflächenspannung besitzt als Wasser). Dadurch war die Wahl eines minimalen Zeitraums möglich, währenddessen die anfallenden Tropfen jeweils registriert wurden. Das Plasma von normalen Versuchspersonen

enthielt nach diesen Untersuchungen 0,2 bis 0,4 uE antidiuretisches Hormon pro ml. GAUER und HEINTZ verwandten jeweils weibliche Tiere, deren Blase über die Urethra katheterisiert wurde. Die Traumatisierung konnte damit sehr gering gehalten werden.

d) **Sensibilitätssteigerung durch Wahl der geeigneten Tiere:**

Die methodischen Schwierigkeiten des Testes rühren in der Hauptsache von der möglichen, durch zahlreiche Stimuli auslösbaren Vasopressininkretion während des Versuchs her. Durch Verwendung von hypophysektomierten Ratten ergaben sich keine Vorteile, da hierbei offensichtlich eine Restsekretion aus dem Hypophthalamus bestand. Eine durch Spontanmutation entstandene Rattenrasse mit angeborenem hypothalamischen Diabetes insipidus zeigte jedoch eine doppelte Empfindlichkeit auf antidiuretisches Hormon als normale Ratten (SAWYER, VALTIN). JONES und LEE konnten bei Verwendung der gleichen Rasse diese Befunde bestätigen. KLEEMANN und Mitarbeiter erkannten lediglich nach Injektion von 10 und 25 uE Arginin Vasopressin eine größere Empfindlichkeit. Bei niedrigeren Dosen von 2,5 bis 5 uE konnte kein Sensibilitätsunterschied festgestellt werden. Die Verwendung dieser Ratten bietet trotzdem den wesentlichen Vorteil, daß eine endogene Sekretion von antidiuretischem Hormon unmöglich ist. Die Spezifität des Nachweises mit Diabetes insipidus Ratten ist in jedem Fall größer als bei Verwendung normaler Tiere.

5.) Einführung in das Untersuchungsvorhaben

Durch die Entwicklung des Bioassays für antidiuretisches Hormon wurden somit zahlreiche, die Hormonsekretion fördernde Substanzen und Reize bekannt. Deren konsequente Ausschaltung am Versuchstier führte zur Steigerung von Spezifität und Sensibilität des Testes. Dies schien eben am besten bei Verwendung der Ratten mit angeborenem Diabetes insipidus gewährleistet zu sein.

Die physiologische Regulation der ADH-Freisetzung aus den Hypophysenhinterlappen ist in groben Zügen, nicht jedoch in ihren Feinheiten geklärt. Ein Anstieg des osmotischen Druckes im Stromgebiet der Arteria carotis führt zu einer erhöhten, eine Abnahme des osmotischen Druckes unter die Normwerte zu einer verminderten Adiuretinfreigabe für Hypophysenhinterlappen. Darüberhinaus greifen wahrscheinlich nervale Afferenzen aus dem Hoch- und Niederdrucksystem in die Adiuretinregulation ein (GAUER und HENRY).

GAUER und HENRY fanden nach Dehnung des linken Vorhofs eine vorübergehende Diurese, die durch Vagusblockade verhindert werden konnte. Sie postulierten einen Reflexbogen vom linken Vorhof über den Nervus vagus zum Hypophysenhinterlappen mit Hemmung der Vasopressinfreigabe bei Druckerhöhung. LYDTIN und HAMILTON konnten diese Diurese durch eine Vasopressininfusion nicht vollständig unterdrücken. Die Sekretionshemmung konnte demnach nicht alleinige Ursache der Diurese sein. Neben den Osmorezeptoren wurden auch Chemorezeptoren im Hochdrucksystem nachgewiesen. Diese konnten z.B. durch Perfusion des Carotis-Sinusgebietes mit sauerstoffarmen Blut stimuliert werden. Der Reflexbogen führt über den Nervus vagus (SHARE). Am wichtigsten scheinen jedoch die Barorezeptoren im Carotis-Sinusgebiet

und im Aortenbogen zu sein. Durch Blutverlust, Verminderung des Extrazellulär-raumes und der Blutdruckamplitude erregt (SHARE, SONNENBERG und PEARCE), wird die Vasopressinsekretion ebenfalls auf vagalem Wege stimuliert.

Ein Nachweis dieser Regelmechanismen war nur unter Versuchsbedingungen möglich, bei denen die Plasmaspiegel von ADH erheblich erhöht waren. Die Schwierigkeit der Methodik liegt jedoch in dem Nachweis physiologischer Adiuretinkonzentrationen und ihrer Schwankungen. Zwar konnte die untere Empfindlichkeitsgrenze des Nachweises so weit gesteigert werden, daß Direktbestimmungen des ADH-Plasmatiters möglich schienen (HEINTZ, GAUER, CZACZKES). Eine Reproduktion der Ergebnisse war jedoch nur den jeweiligen Untersuchern vorbehalten.

Wenn schon die Bedeutung des ADH unter physiologischen Bedingungen nicht ganz geklärt ist, wird seine Einordnung in pathophysiologische Regulationen und die Zuordnung eines entsprechenden Stellenwertes im Ablauf pathophysiologischer Prozesse noch viel schwieriger.

So sind die Kenntnisse über vermehrte Freisetzung und Bildung von ADH in verschiedenen Krankheitsbildern noch unzureichend. So wurde auf erhöhte ADH-Plasmaspiegel bei Zuständen mit Wasserretention (Herzinsuffizienz, Lebercirrhose) geschlossen, die sowohl durch verminderte Inaktivierung als auch durch gesteigerte Inkretion entstehen konnten. Eine Klärung der oft einander widersprechenden Ergebnisse schien nur durch exakte Bestimmung der ADH-Plasmaspiegel bei diesen Krankheitsbildern möglich zu sein. Die verzögerte Wasserausscheidung bei Nebennierenrindeninsuffizienz wurde ebenfalls auf erhöhte Vasopressininkretion bezogen (AHMED).

SCHWARZ und BARTTER beschrieben ein vor allem bei Bronchialcarcinom, chronischer Tuberkulose und cerebralen Erkrankungen vorkommendes Syndrom, das trotz Hyponatriämie mit renalem Salzverlust einhergeht. Bei Wasserbelastung bleibt die Urinverdünnung aus, es resultiert eine Wasserintoxikation. Es wurde eine vermehrte Abgabe von ADH angenommen, die vermutlich nicht den Gesetzen der Steuerung unterliegt. Dabei blieb ungeklärt, ob es sich um antidiuretisches Hormon aus dem Hypophysenhinterlappen oder um antidiuretisch wirksame Produkte aus dem Tumor handelte.

Kürzlich wurde auf antidiuretische Aktivitäten des psychotropen Antiepileptikums Tegretal bei Kranken mit Polyurie und Polydypsie nach Hypophysenoperation und mit echtem Diabetes insipidus hingewiesen (FRAHM). Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht geklärt. Da die meisten Patienten chirurgisch hypophysektomiert waren, erscheint eine ADH-Freisetzung aus den hypothalamischen Zentren möglich.

Allein die Vielfalt der in der Literatur als jeweils neueste und beste Verfahren angepriesenen Methoden belegt die Schwierigkeiten im biologischen Nachweis physiologischer ADH-Konzentrationen. Das Schrifttum ist hier voller Widersprüche und die einzelnen Untersucher arbeiten praktisch immer mit eigenen Modifikationen. Ausgangspunkt der eigenen Untersuchungen zur Entwicklung einer Nachweismethodik für ADH war die Vorstellung, daß die empfindlichsten bisher zugängigen Parameter einer Adiuretinwirkung kombiniert werden müssen, um Spezifität und Empfindlichkeit der Methode auf ein Optimum zu steigern. Da eine Erhöhung der Wasserrückdiffusion im Bereich des peripheren Nephrons als wichtigste Folge einer ADH-Wirkung sowohl zu einer Abnahme des Urinvolumens, als auch zu einem Konzentrationsanstieg im

Endharn führt, waren die auf Urinzeitvolumen beruhenden Nachweismethoden mit einer meßtechnisch davon unabhängigen empfindlichen Registrierung der Urinelektrolytkonzentration zu kombinieren.

II. M e t h o d i k

Als Versuchstiere dienten junge, männliche Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 100 und 200 gr. Sie wurden bei konstanter Raumtemperatur gehalten und erhielten eine Standardkost (Altromin) sowie Wasser ad libitum.

Vor dem Versuch erhielten die Tiere jeweils 2 mal täglich 5% ihres Körpergewichtes Flüssigkeitsmischungen unterschiedlicher Zusammensetzung über eine Schlundsonde. Die Zahl der Versuchstiere, die mit einem Hydrierungsschema behandelt wurden, ist jeweils in Klammern angegeben.

- a) An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes Leitungswasser (33)
- b) An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes einer wässrigen Glukose-Alkohollösung (5% Glukose, 3% Alkohol) (36)
- c) An zwei aufeinanderfolgenden Tagen 2 mal 5% des Körpergewichtes Darrow II Lösung (47)
- d) An zwei aufeinanderfolgenden Tagen 2 mal 5% des Körpergewichtes einer wässrigen Lösung mit 0,9% NaCl und 5% Glukose (31)
- e) An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes einer Mischung aus 5% Glukose, 3% Alkohol und 2% NaCl (10)
- f) An einer Gruppe von 5 Versuchstieren wurde der unspezifische Effekt der Einführung der Schlundsonde ohne Gabe von Flüssigkeiten untersucht.

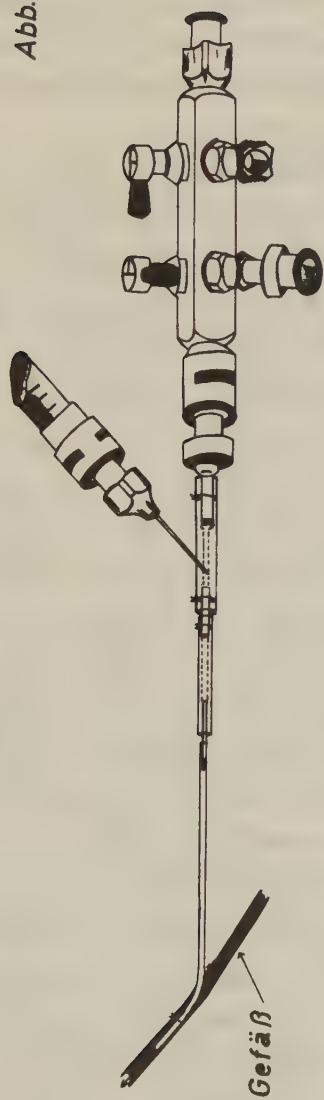
Nach 18 - 20 Stunden Nahrungskarenz erhielten die Tiere am Versuchstag über einen Magenschlauch zweimal im Abstand von 60 min. jeweils 5 ml/100g Körpergewicht lauwarmes Leitungswasser. Dabei zeigten die Ratten - wohl auf Grund der Gewöhnung an die Einführung der Schlundsonde - keine Spuren von Erregung. 1 Stunde später erhielten sie nochmals 5% ihres Körpergewichtes einer 12 %igen wässrigen Alkohollösung. Die Tiere wurden während der Vorbehandlungen im Labor in Stoffwechselkäfigen gehalten oder nach Vorhydrierung im Tierstall nach Eintritt der Narkose in das Labor gebracht. Es standen pro Versuchstag mindestens 2 Tiere zur Verfügung, die Ratte mit der momentan größten Urinausscheidung wurde präpariert, die andere wieder in den Tierstall zurückgebracht.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe 15 - 30 min. nach der letzten Verabreichung der 12 %igen Alkohollösung wurden die Ratten in Rückenlage fixiert. Von einem ca. 1 cm langen medianen Hautschnitt aus wurde zuerst die Trachea mit einer stumpfen Klemme unter sorgfältiger Schonung von Gefäßen und Nerven freipräpariert. Nach Ausführung eines kleinen queren Schnittes in einem Zwischenknorpelraum wurde eine gebogene Metallkanüle (Innendurchmesser 2,5 mm) oder ein 2 cm langer Polyäthylschlauch (Innendurchmesser 1,8 mm) 1 cm weit eingeschoben und durch eine Ligatur fixiert. Anfallendes Sekret konnte somit ohne Berührung der Schleimhäute abgesaugt werden.

Abb. 1

Lage des Venenkatheters in der V. jugularis. Die Injektion der Testsubstanzen erfolgt mit einer Tuberkulinspritze über den dickwandigen Silikongummischlauch.

Abb. 1



Vom gleichen Hautschnitt wurde die rechte V. jugularis ext. freipräpariert, ein Polyaethylschlauch (Außendurchmesser 1 mm) wurde mindestens 1 cm weit eingeführt und durch eine Ligatur in dem Gefäß fixiert. Nach kranial wurde das Gefäß unterbunden. Der Polyaethylschlauch stand über einen dickwandigen Silikonschlauch, der die Injektion kleinster Testvolumina (0,1 ml) unter Sicht ermöglichte, mit einem Dreiwegehahn in Verbindung (Abb.1). Das ganze System war vorher mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt worden. Der Dreiwegehahn wurde an eine Infusionspumpe angeschlossen, die das Versuchstier mit einer 0,45 %igen Kochsalzlösung, die 3% Alkohol enthielt, aufhydryerte. In einer getrennten Versuchsreihe wurde bei 14 Ratten statt der Jugularvenen die Schwanzvene kanüliert. Zuletzt wurde über einen medianen suprabubischen Hautschnitt der Bauchraum in der linea alba eröffnet. Durch Druck auf die Bauchdecken schlüpfte die gefüllte Harnblase aus dem Bauchraum, der Blasenscheitel wurde doppelt angeklemt. Zwischen beiden Klemmen wurde in einem gefäßarmen Gebiet mit einer spitzen Schere die Blase eröffnet. Nach Einführen eines mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Katheters wurde die Blase derart abgebunden, daß möglichst wenig Totraum in der Blase entstand. Nach Verschuß der Bauchdecken durch zwei Nähte wurde die Ratte auf ihre rechte Seite gelagert und nach Einsetzen einer ausreichenden Diurese (mindestens 4 ml/Stunde) auf eine Waage gebracht. Danach folgte der Anschluß des Blasenkatheters an die Leit-

fähigkeitskammer und den Tropfenzähler. Der Nachfluß wurde über eine Infusionspumpe gesteuert. Als Tropfen-zählanlage wurde eine apparative Anordnung entwickelt, die Abb. 2 in Blockskizze zeigt.

Der von der Ratte (1) kommende Urin fließt durch die Leitfähigkeitskammer (zwei Platinelektroden in Glas eingeschmolzen). Zur Einhaltung von Temperaturkonstanz liegt die Kammer in einem Behälter aus Plexiglas (3), der an einen Thermostaten angeschlossen werden kann. Von 2 läuft der Urin über einen Filter (6) zur Tropfnadel (7). Der Tropfenradius kann durch eine Gegenkapillare aus Glas (9) begrenzt werden. Über einen Nebenarm kann vor dem Filter und der Tropfnadel der Druck in dem System (5) kontrolliert werden. Von der elektrischen Lichtschranke (8) werden die durch die Tropfen verursachten elektrischen Impulse über einen Verstärker (10) auf ein Doppelrelais (11) übertragen. Von hier wird einerseits die Schalteinheit (12) für das Magnetventil (15) gesteuert, das den Nachfluß in die Jugularvene der Ratte (16) aus den Vorratsgefäßen (13,14) reguliert. Andererseits wird der Impuls über den Verstärker (17) auf den Speicher übertragen. Nach wählbaren Zeitintervallen (19) wird der Speicher durch Erdschluß entladen. Die Spannung am Speicher wird über einen dem Registriersystem (Zweikanalkompensationsschreiber Multipen-Rikadenki-Hellige) Freiburg (20) angehörenden Verstärker auf den Direktschreiber übertragen. Dadurch ergeben sich stufenförmig ansteigende Kurven mit einer die Tropfenzahl pro Zeiteinheit ange-benden Ausschlagshöhe.

Die elektrische Leitfähigkeit des Urins wurde in einer Brückenschaltung gemessen (22); die Brücke wird mit Wechselstrom (23) gespeist. Das über den Verstärker (24) verstärkte Signal wird galenisch durch eine Drossel (25) von dem zweiten Kanal des Kompensationsschreibers getrennt auf den Kompensationsschreiber (27) übertragen. Durch eine variable Gegenspannung (26) wird eine Nullpunkteinstellung ermöglicht. Zuletzt wurde die Versuchsanordnung dahingehend vereinfacht, daß Leitfähigkeitskammer und Tropfnadel über einen Gummischlauch verbunden wurden, Manometer (5) und Filter (6) waren dadurch ausgeschaltet. Um einen kontinuierlichen Sog auf die

Abb. 2

Blockskizze der apparativen Anordnung.
Einzelheiten s. Text

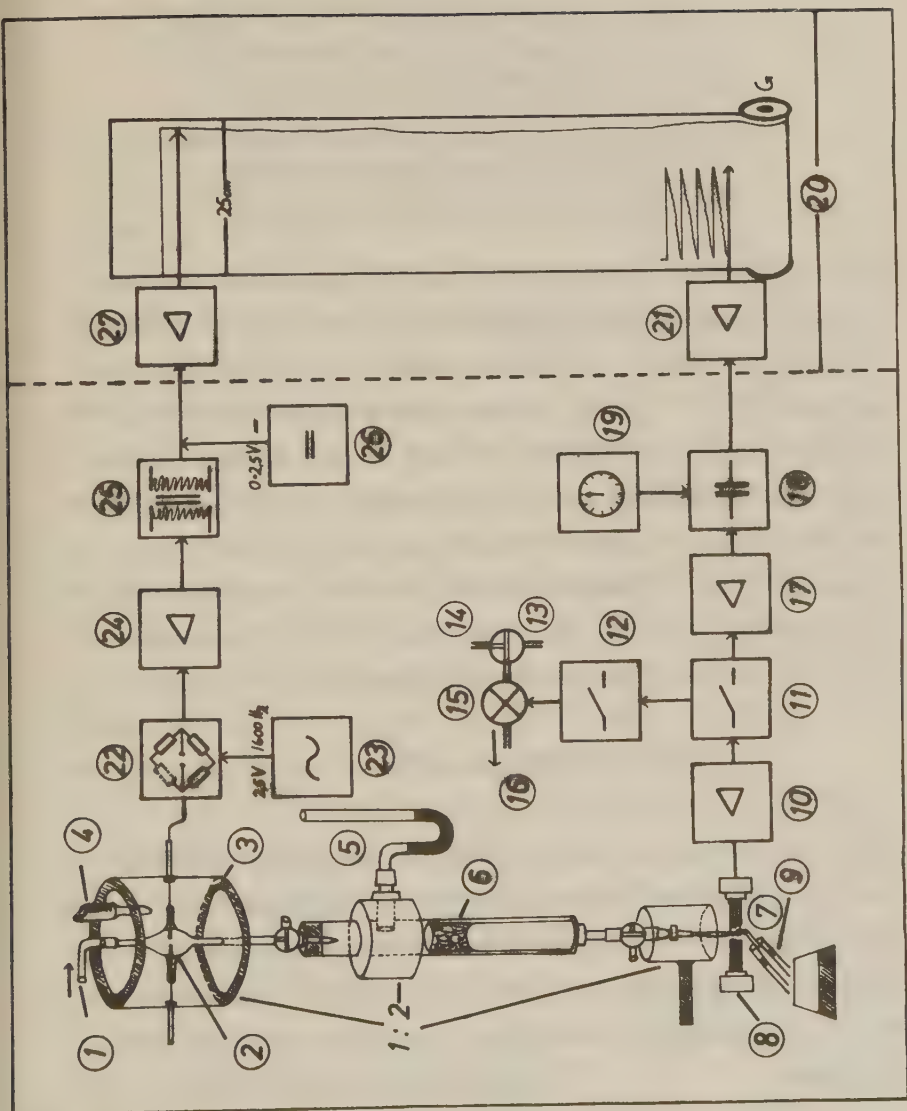


Abb. 2

Blase zu gewährleisten, bestand zwischen Rattenblase und Tropfnadel (7) ein Höhenunterschied von 30 cm. Als Gegenkapillare verwendeten wir am Schluß ausschließlich eine Flügelkanüle, die mit einem Gummistopfen isoliert, von einem Hebelarm über ein Kugelgelenk an einem Stativ befestigt war. Die elektrischen Impulse wurden somit direkt über an Tropfnadel und Flügelkanüle angeklebte Drähte übertragen.

Nach dem Einsetzen einer ausreichenden, konstanten Diurese 30-60 min. nach Beendigung der Präparation begannen die Injektionen der Leer- und Testlösungen in einem Volumen von jeweils 0,1 - 0,5 ml. Je nach Wirkungsdauer der vorangehenden Injektion schwankte der Zeitabstand zwischen den einzelnen Injektionen von 20-60 Minuten. Als Wirkungsindex wählten wir die Prozentzahl der Harnretention ($x\%R$). Die Tropfenzahl der Periode von 8 min. vor bis 2 min. nach der Injektion (a) wird mit der Tropfenzahl von 2-12 min. nach Injektion (b) wie folgt in Beziehung gesetzt:

$$x \% R = \frac{(a-b)}{a} \cdot 100$$

Eine Verminderung der Tropfenzahl nach Injektion wurde nur dann als spezifisch bewertet, wenn zeitlich etwas verspätet auch die Leitfähigkeit vorübergehend anstieg, um dann wieder gemeinsam mit dem Urinvolumen auf ein konstantes Niveau zurückzugehen. Zudem mußte eine Dosiswirkungsrelation vorliegen.

III. E r g e b n i s s e

1.) Erfolgsquote der Präparationen

Von den 324 zur Präparation vorbereiteten Tieren wurden 162 mit der jeweils größeren Ausgangsdiurese präpariert und ihr Urinzeitvolumen protokolliert. Von diesen konnten 131 mal Diuresen von minimal 4 ml/Stunde und einer Mindestdauer von 3 Stunden aufrecht erhalten werden. 5 mal wurden σ_u und V_u über 24 h aufgezeichnet, längstens über 46 h. Dabei war auffällig, daß nachts (absolute Ruhe) sich σ_u und V_u laufend im Sinne von Pendelbewegungen änderten. Es ist bemerkenswert, daß auch während Perioden absoluter Ruhe Spontanschwankungen auftraten. 37 Versuche zeigten von Anfang an eine sehr unregelmäßige Diurese (mit Schwankungen von mehr als 20 % des Urinzeitvolumens innerhalb 20 sec.). In diesen war keine Aussage über einen anti-diuretischen Effekt nach Injektion des Testmaterial möglich. An 31 Versuchstagen lag die Ausgangsdiurese unter 4 ml/Stunde, dementsprechend lag auch eine hohe Leitfähigkeit vor. An diesen Tagen wurde kein ADH verabreicht, da hohe endogene Adiuretinspiegel zu erwarten waren.

2.) Beschreibung der Versuchsverläufe

- a) Einfluß der Vorbehandlung auf das Harnzeitvolumen (V_u) und Leitfähigkeit des Urins (σ_u).

Tab. 1 zeigt die Zusammenfassung sämtlicher Versuche, aufgeteilt nach den verschiedenen Flüssigkeitsvorbehandlungen der Ratten. In Gruppe b (wässrige Lösung von 5% Glukose und 3% Alkohol) findet sich die bei weitem geringste Versuchszahl mit mangelnder Diurese. Die Versuche mit regelmäßiger Diurese sind ebenfalls in Gruppe b am häufigsten vertreten. Die Anzahl der Versuchstage mit unregelmäßiger Diurese findet sich in allen Gruppen (entsprechend den verschiedenen Vorhydrierungen) etwa gleichmäßig verteilt. Ein schwankendes Urinzeitvolumen steht deshalb wahrscheinlich nicht in Zusammenhang mit der Vorbehandlung der Tiere.

b) Urin-Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit (σ_u) des Urins war während eines Versuchs ebenfalls Schwankungen ausgesetzt, die spiegelbildlich, jedoch zeitlich versetzt (Totraum zwischen Meßkammer und Blase) den Urinvolumina entsprachen. Nach 2 - 3 Stunden resultierte in der überwiegenden Anzahl der Versuche ein kontinuierlicher Anstieg von σ_u . Damit wurde eine laufende Zunahme der Elektrolytausscheidung angezeigt. Das typische Verhalten der Leitfähigkeit sieht man in Abb. 3, in der ein Kollektiv von 13 aufeinanderfolgenden Versuchen aus Gruppe b aufgezeichnet ist. Dabei wird der bereits nach wenigen Stunden erfolgende Anstieg von σ_u deutlich. In 3 Versuchen wurde 0,9 %ige Kochsalzlösung als Infusion verwandt; sie sind mit entsprechenden Ziffern gekennzeichnet. Davon wurde 2 mal ein prinzipiell gleicher Verlauf der Leitfähigkeit registriert. Im 3. Versuch, mit hohem Ausgangswert von σ_u , wurde nach 3 1/2 Stunden eine

Tabelle 1

	a	b	c	d	e	f	zusammen
Anzahl der gesamten Versuchstage	33	36	47	31	10	5	162
davon mit mangelnder Diurese	10	1	10	7	2	1	31
entspricht in Prozent der gesamten Versuchstage	30	3	21	23	20	20	19
Anzahl der Versuchstage mit unregelmäßiger Diurese	11	8	8	8	3	1	39
entspricht in Prozent der gesamten Versuchstage	33	22	17	26	30	20	24
Anzahl der Versuchstage mit regelmäßiger Diurese	12	27	29	16	5	3	92
entspricht in Prozent der gesamten Versuchstage	38	75	62	52	50	60	57

Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche, aufgetragen nach den verschiedenen Vorbehandlungen
(s. auch Methodik)

- An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes Leitungswasser (33)
- An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes einer wässrigen Glukose-Alkohollösung (5% Glukose, 3% Alkohol) (36)
- An zwei aufeinanderfolgenden Tagen 2 mal 5% des Körpergewichtes Darrow II Lösung (47)
- An zwei aufeinanderfolgenden Tagen 2 mal 5% des Körpergewichtes einer wässrigen Lösung mit 0,9% NaCl und 5% Glukose (31)
- An einem Tag 2 mal 5% des Körpergewichtes einer Mischung aus 5% Glukose, 3% Alkohol und 2% NaCl (10)
- An einer Gruppe von 5 Versuchstieren wurde der unspezifische Effekt der Einführung der Schlundsonde ohne Gabe von Flüssigkeiten untersucht.

Abb. 3

Verlauf der Leitfähigkeit in 13 Versuchen aus Gruppe b
Einzelheiten s. Text

LEITFÄHIGKEIT

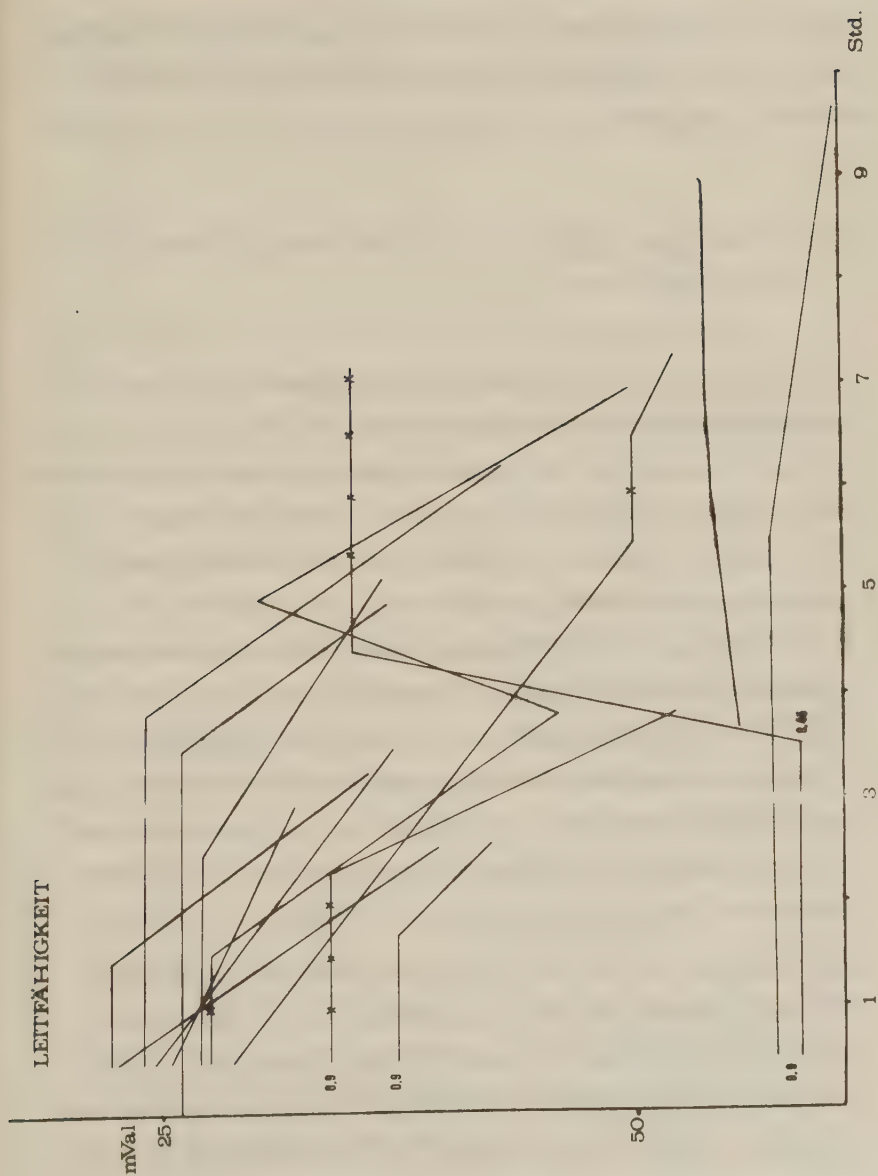


Abb. 3

0,45 %ige Kochsalzlösung infundiert, σ_u sank daraufhin kontinuierlich, um später für einige Stunden auf konstantem Niveau zu bleiben.

c) Zeitpunkt des Eintritts antidiuretischer Effekte nach ADH-Verabreichung.

Die Kreuze in Abb. 3 zeigen jeweils Zeitpunkt und Höhe der Leitfähigkeit während ADH-Injektionen, die der in der Methodik angegebenen Definition einer ADH-Wirkung entsprachen. Aus der Abb. wird ersichtlich, daß die Verabreichung von Adiuretin nur jeweils dann von einem definitionsgemäßen antidiuretischen Effekt gefolgt wird, wenn sie in eine Periode konstanter Leitfähigkeit fiel. Zum Zeitpunkt leicht steigender Leitfähigkeit konnte während der ganzen Versuchsserie nur 7 mal (entsprechend 9% aller "erfolgreichen" Injektionen) eine definitionsgemäße antidiuretische Wirkung registriert werden. Eine konstante Elektrolytausscheidung der Versuchstiere muß deshalb zur Testung antidiuretischer Aktivitäten vorausgesetzt werden.

Zum Vergleich sei in Abb. 4 das Verhalten der Leitfähigkeit mit identischer Versuchsanordnung und Vorbehandlung der Ratten aufgeführt. Unterschiedlich waren lediglich der Zeitpunkt der Versuche (1 Jahr zuvor) und die Untersucher. Prinzipiell erscheint der Anstieg der Leitfähigkeit geringer, ihre Schwankung jedoch stärker ausgeprägt zu sein. Der Unterschied ist demnach entweder auf die verschiedenen

Perioden oder die unterschiedlichen Untersucher zu beziehen, damit wird jedoch eine Reproduktionsmöglichkeit der Versuche überhaupt in Frage gestellt.

d) Reaktionsmöglichkeiten nach ADH-Verabreichung

Bei 157 Einzelinjektionen von ADH (entsprechend 39% der Gesamtzahl) änderten sich weder ζ_u noch V_u . Den bereits in Abschnitt Methodik angeführten strengen Kriterien eines ADH-Nachweises genügten nur 81 Einzelversuche (d.h. etwa 20% der Gesamtzahl von Injektionen). Dazu kommen Testinjektionen mit unterschiedlichen Reaktionstypen, die eine ADH-Wirkung vermuten lassen, ohne der strengen Definition eines ADH-Nachweises zu entsprechen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 2 zusammengestellt. Dabei ist das Verhalten von ζ_u und V_u nach Verabreichung von jeweils 5 und 10 uE Vasopressin aufgezeichnet. Da die einzelnen Versuche hier getrennt nach Veränderungen von ζ_u und V_u ausgewertet wurden, ergibt die Quersumme der unterschiedlichen Reaktionstypen eine Zahl, die die Einzelversuchszahl übersteigt. Die Verabreichung von ADH kann demnach zwar von vorübergehender Antidiurese oder Steigerung der Leitfähigkeit gefolgt werden, jedoch ohne dem geforderten spiegelbildlichen Verhalten beider Parameter. Oder sie reagieren zwar, ohne jedoch ihren Ausgangswert wieder zu erreichen.

Abb. 4

Verlauf der Leitfähigkeit während 18 Versuchen aus Gruppe b 1 Jahr
vor Abb. 3

LEITFÄHIGKEIT

mVal

25

50

10 Std.

Abb. 4

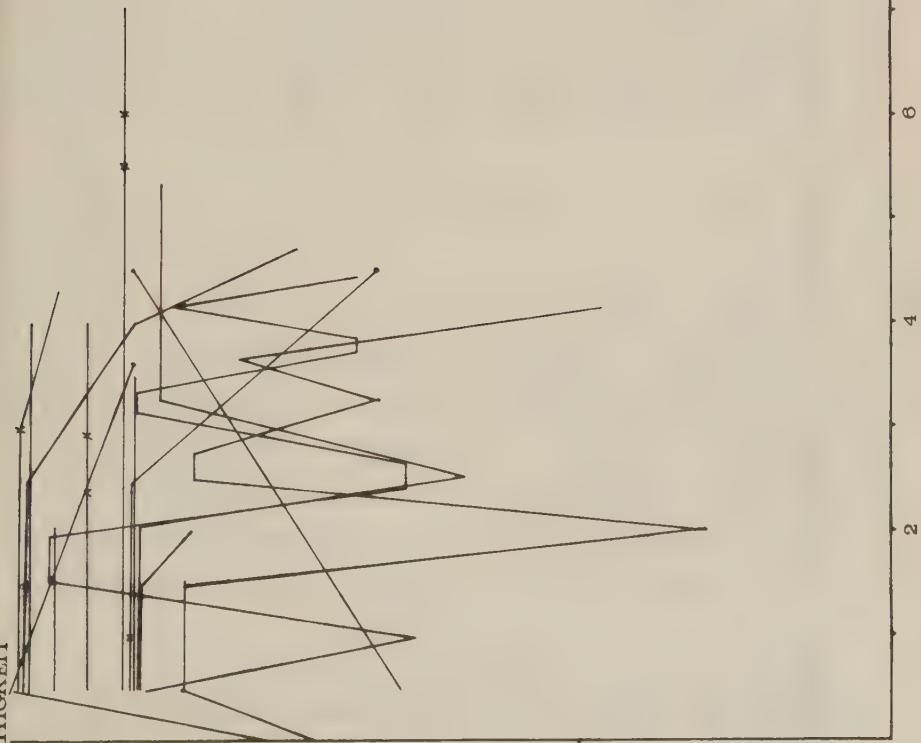


Tabelle 2

	Antidiurese	Leitfähigkeit	Leitfähigkeit	Antidiurese	Leitfähigkeit	Antidiurese	Leitfähigkeit	Antidiurese	Leitfähigkeit	Total
a) n	7	11	2	10	3	9	3	3	3	34
in % von Total	19	33	6	30	9	9	9	9	9	34
b) n	12	12	8	8	7	7	3	3	3	51
in % von Total	23	23	16	16	14	6	6	6	6	51
c) n	10	13	8	3	7	7	1	1	1	42
in % von Total	24	31	19	7	17	2	2	2	2	42
d) n	2	1	1	1	1	1	1	1	1	12
in % von Total	17	8	8	8	8	8	8	8	8	12
e) n	2	2	6	7	3	3	3	3	3	13
in % von Total	15	15	46	54	23	23	23	23	23	13
f) n	6	5	2	2	2	2	3	3	3	18
in % von Total	33	28	11	11	11	11	11	11	11	18

Die Reaktionsmöglichkeiten nach den verschiedenen Vorbehandlungen nach Injektion von 5 und 10 uE.

Zusammenfassend sind die Versuche auf 5 und 10 uE Vaso-pressin in den Kreisdiagrammen in Abb. 5 widergegeben. Von insgesamt 170 Einzelinjektionen dieser Dosierung konnte in 34 Fällen keine Reaktion beobachtet werden, im Kreisdiagramm wird diese Anzahl durch eine leere Fläche ausgedrückt. Die prozentuale Verteilung der wahrscheinlichen ADH-Wirkungen (nicht den strengen Kriterien entsprechend) zeigt die grobschraffierte Fläche, der feinschraffierte Teil entspricht den "positiven" Reaktionen. In den nach einzelnen Vorbehandlungsgruppen aufgeteilten Kreisdiagrammen erscheint die Gruppe b erneut mit der größten Anzahl "erfolgreicher" Einzelinjektionen.

e) Dosiswirkungsrelation antidiuretisch wirksamer ADH-Injektionen.

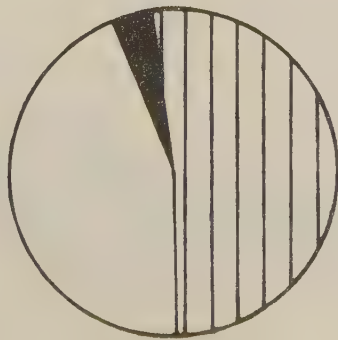
Beim Betrachten der semilogarithmischen Auftragung der 81 Injektionen mit definitionsgemäßem antidiuretischen Effekt (s. Abb. 7), fällt der breite Streubereich gleicher ADH-Dosen in verschiedenen Versuchen auf. Eine Dosiswirkungsrelation ist nicht zu erkennen. Prinzipiell sind Streuungen geradezu charakteristisch für biologische Nachweismethoden, mit Unterschieden von einigen 100% scheint hier jedoch das übliche Maß überschritten zu sein. Dabei müssen Fehler der Methodik an sich, als auch unterschiedliche Wirkungsgrade der Testlösungen (unterschiedlich lange Aufbewahrung im Eisschrank) diskutiert werden.

Abb. 5

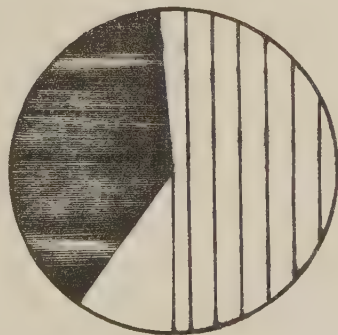
Zusammenfassung der Reaktionen nach 5 und 10 uE Vasopressin

reaktion: Leitfähigkeit reagiert m. Anidiurese: grobschraffiert: entweder Leitfähigkeit od. Anidiurese, leer: keine Reaktion,

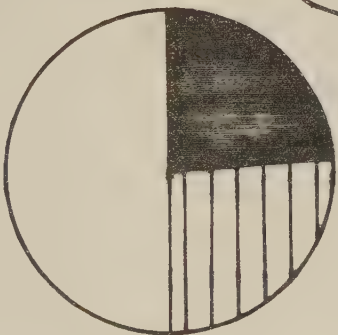
(a) n. 34



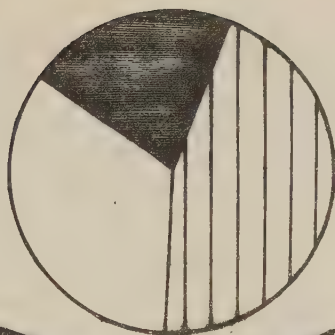
(b) n. 51



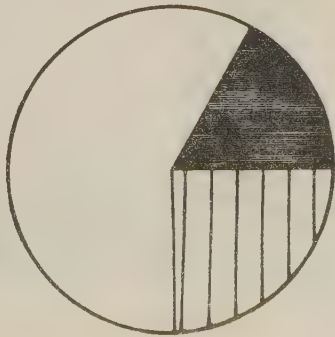
(c) n. 42



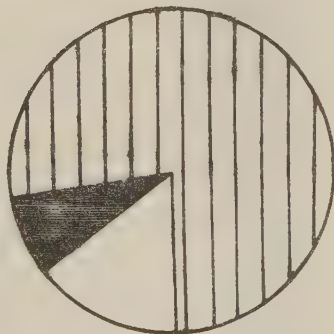
zusammen n. 170



(d) n. 12



(e) n. 13



(f) n. 18

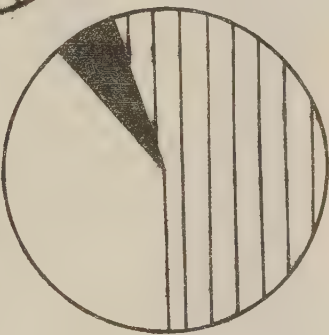


Abb. 5

Abb. 6

Urinzeitvolumen (V_u) und Urinleitfähigkeit (σ_u) einer Ratte nach 4 maliger i.v. Injektion von Testlösungen: A: 0,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung = Placebo, B: 10 uE einer frisch angesetzten Lösung, C: 10 uE einer 8 Tage alten Lösung, D: 10 uE einer frisch angesetzten Lösung. Einzelheiten s. Text

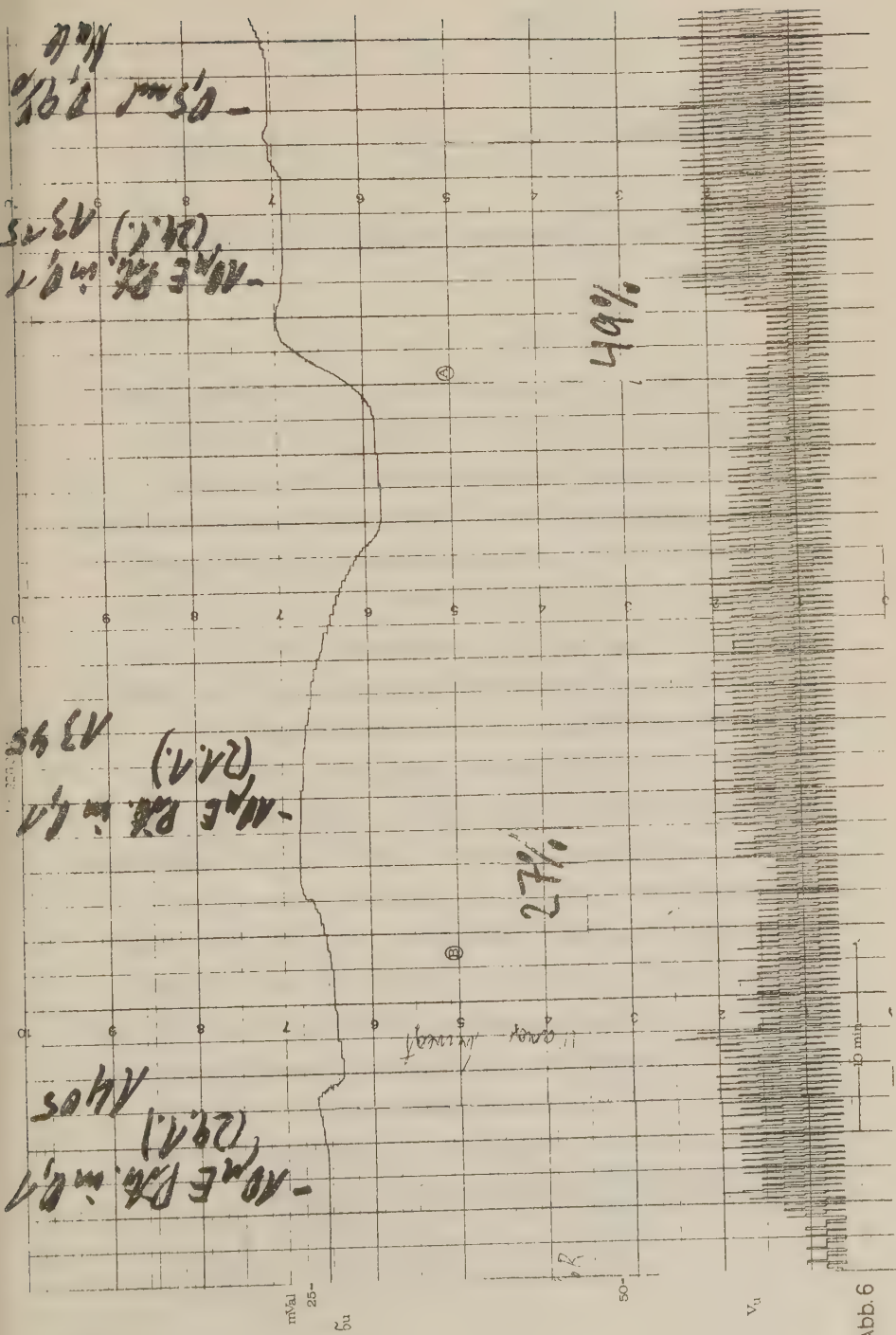


Abb. 6

3. Fehlersuche

- a) Einfluß der Aufbewahrung von ADH-Lösungen auf ihre Aktivität.

In Tab. 3 sind die "positiven" und völlig wirkungslosen ADH-Injektionen sämtlicher Versuche gegenübergestellt. ζ_u und V_u werden mit steigenden Dosen ADH zunehmend definitionsgemäß beeinflusst. In dem Dosierungsbereich von 20 - 50 uE wird nur in 10% der Versuche keine Reaktion beobachtet. Demnach müßte in diesem Bereich die untere Empfindlichkeitsgrenze der angegebenen Methodik liegen. Bei Vergleich der Versuchstage mit neu angesetzter ADH-Lösung (Üblicherweise wurden die Verdünnungen bei 4°C im Eisschrank aufbewahrt), steigt die Erfolgsquote von "positiven" Einzelinjektionen von 20% auf 41%. Demnach ist ein Wirkungsverlust der aufbewahrten Verdünnungen anzunehmen. Abb. 6 zeigt ein typisches Beispiel von 5 identischen Versuchen (Versuch Nr. 115, 125, 137, 140, 156), in denen die Wirkung von 10 uE ADH einer 1 Woche alten und einer neu angesetzten Verdünnung verglichen werden. Während 10 uE der frisch angesetzten Pitressinlösung eine 49 %ige Retention des Harnvolumens bewirken, ruft die gleiche Dosis einer 8 Tage früher angesetzten Pitressinlösung lediglich eine Retention von 27% hervor.

Tabelle 3

	a)	b)	c)	d)	e)	f)	Zusammen	%
	n	n	n	n	n	n		%
Ges. Inj.	46	113	122	73	15	31	400	
AD $\searrow$, L $\wedge$	1	32	27	17	1	4	81	20
AD $\emptyset$, L $\emptyset$	26	57	52	44	3	9	157	39
ab 5 uE								
Ges. Inj.	34	65	74	19	14	31	263	
AD $\searrow$, L $\wedge$	1	30	24	8	1	4	68	26
AD $\emptyset$, L $\emptyset$	14	41	21	7	2	9	61	23
5,0 u. 10uE								
Ges. Inj.	34	51	42	12	13	18	170	
AD $\searrow$, L $\wedge$	1	20	10	2	1	1	35	21
AD $\emptyset$, L $\emptyset$	15	44	21	7	2	7	57	34
20,0-50,0uE								
Ges. Inj.	1	15	15	6	1	13	51	
AD $\searrow$, L $\wedge$	0	8	9	5	0	3	25	50
AD $\emptyset$, L $\emptyset$	0	3	0	0	0	2	5	10

Gegenüberstellung der positiven (AD $\searrow$ = vorübergehende Antidiurese, L $\wedge$ = vorübergehend steigende Leitfähigkeit) und wirkungslosen Injektionen (AD $\emptyset$; L $\emptyset$). Ausgeschlossen sind die nicht definitionsgemäßen Reaktionen (s. Tabelle 2)

- a) = 1 Tag H₂O
 b) = 2 Tage 5 % Glukose, 3 % Alkohol
 c) = 2 Tage Darrow II
 d) = 2 Tage 0,9 % NaCl, 5 % Glukose
 e) = 1 Tag 5 % Glukose, 3 % Alkohol und 2 % NaCl
 f) = Schlauch schlucken.

Abb. 7: Dosiswirkungsrelation von 2,0 bis 100,0 uE Vasopressin
(1968/69)

%R VERSUCHSPERIODE 1968/69

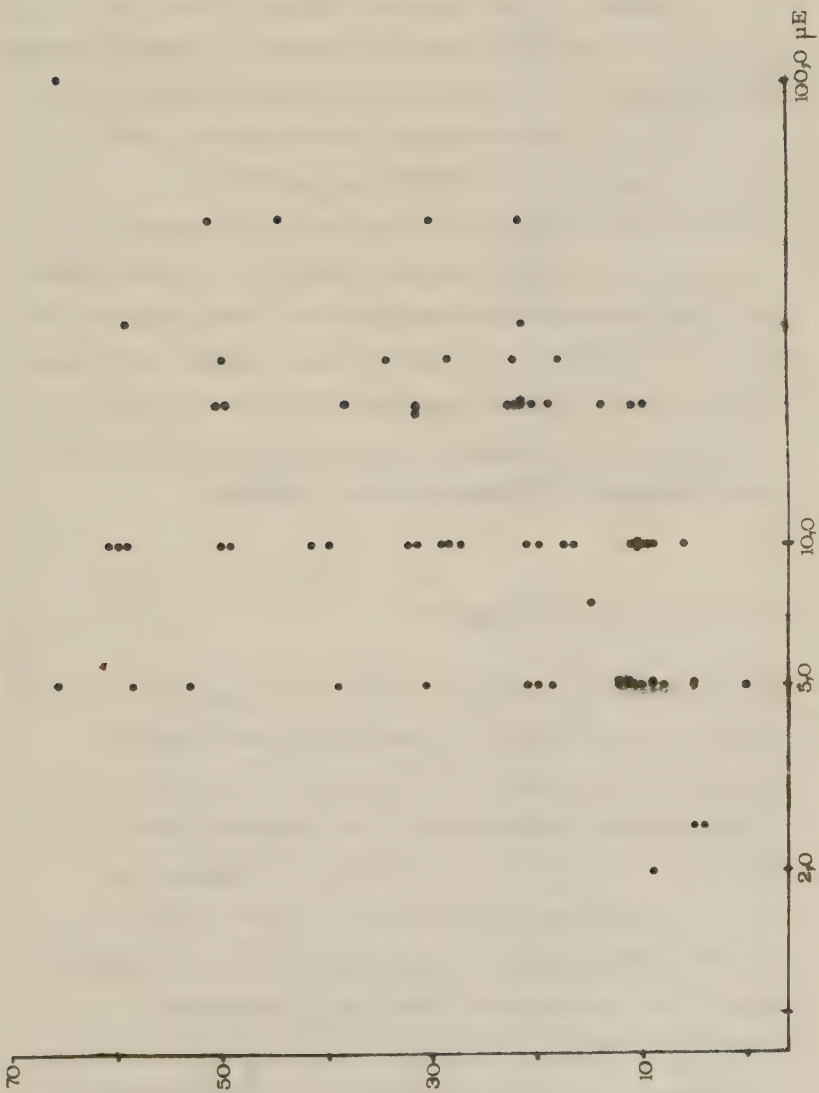


Abb. 7

b) Einfluß intragastraler Alkoholgaben

Die fortlaufende Hydrierung und Narkose während des Versuchs wird vielfach durch intragastrale Dauerinfusionen aufrechterhalten. Vereinzelt wurden sogar fraktionierte, dem jeweiligen Harnzeitvolumen entsprechende Alkohol-lösungen verabreicht (LITTLE und RADFORD).

Es wurde deshalb der Einfluß oraler Alkoholgaben (0,5 - 2,0 ml einer 12 %igen Alkohollösung) an 35 verschiedenen Rattenpräparationen auf das Harnzeitvolumen geprüft. Das Ergebnis zeigt Tab. 4: $\bar{G}_u$ und V_u können sowohl ansteigen, als auch abfallen oder unbeeinflusst bleiben. Perorale Alkoholgaben sind demnach wenig zur Aufrechterhaltung eines konstanten Harnzeitvolumens geeignet.

c) Effekt der Placebogaben

Als Leermaterial (Placebo) wurde 0,45 %ige NaCl-Lösung verwandt. Die Reaktion des Harnzeitvolumens nach 61 Injektionen von jeweils 0,5 ml gibt Tab. 4 wider. An 3 Versuchstagen zeigten sich 8 mal unspezifische Antidiuresen, die auch durch sorgfältigstes Waschen und Spülen der Spritzen nicht zu beeinflussen waren. Erst nach Verwendung anderen Spritzmaterials oder Auskochen waren diese Antidiuresen nicht mehr nachweisbar. Es ist also auf peinlichste Sauberkeit des verwandten Materials zu achten. Im übrigen fanden sich nach Verabreichung der NaCl-Lösung keine Veränderungen oder eine im Sinne der Volumenbelastung leicht gesteigerte Diurese.

Tabelle 4

	D Ø	D ↗	D ↘	zusammen
	L Ø	L ↗	L ↘	
NaCl 1966	4	0	11	15
NaCl 67-68 (1967-68)	48	8	5	61
12% Alkohol p.o.	10	12	13	35

Die Beeinflussung von $\bar{C}u$ und Vu durch i.v. NaCl Lösungen und perorale Alkohollösungen
(Versuchspersonen 1967 - 68 u. 1966)

d) Effekt der Schwanzvenenkanülierung auf die Rattenpräparationen.

Um das Operationstrauma zu vermindern, wurde in 14 Experimenten statt der Vena jugularis die Schwanzvene kanüliert. Versuchsdauer, Gleichmäßigkeit des Harnzeitvolumens und Empfindlichkeit der ADH-Lösungen wurden damit nicht gesteigert, weshalb diese Methodik nicht weiter verfolgt wurde. Für eine eigene qualitative Wertung war die Versuchsanzahl leider zu gering.

4.) Ergebnisse der ursprünglichen Versuchsreihe

In den zeitlich 2 Jahre früher gelegenen Vorversuchen wurde ein völlig unterschiedliches Ergebnis erzielt. Dabei wurde die von HEINTZ angegebene Versuchsanordnung verwandt: Die Harntropfen werden dabei über zwei mit 50% gefüllte Woulf'sche Flaschen geleitet und dabei durch die geringere Oberflächenspannung des Alkohols in mehrere kleine Tropfen fraktioniert. Diese werden photoelektrisch registriert. Die Tiere waren nach Gruppe b mit Glukose-Alkohol-Gemisch vorbehandelt worden. Mit 29 präparierten Ratten konnten in 14 Fällen eine konstante Diurese von mindestens 4 ml/Stunde und 4 Stunden Versuchsdauer erreicht werden. Auf die Verabreichung von jeweils 0,5 ml einer 0,45 %igen NaCl-Lösung reagierten die Ratten bei weitem empfindlicher : Von 15 Injektionen hatten 11 einen

diuretischen Effekt im Sinne einer Volumenbelastung, nur in 4 Fällen zeigte sich kein Einfluß auf das Harnzeitvolumen (zum Vergleich: in den späteren Versuchen waren 10% aller NaCL-Injektionen von einer Diuresesteigerung gefolgt, s.Tab. 4).

Als Testmaterial war damals ausschließlich Pitressin^R in einer Dosierung von 0,1 bis 5,0 uE verwandt worden. Von 29 Testungen waren 20 von einer vorübergehenden Anti-diurese gefolgt, die semilogarithmische Dosiswirkungsrelation zeigt Abb. 8. 4 mal wurde die Harnausscheidung nicht beeinflusst (Dosis: 0,1 bis 1,0 uE). In 5 Fällen sank die Diurese, um nicht mehr auf ihren Ausgangswert zurückzukehren. Insgesamt ist die Empfindlichkeit der Methodik in den früheren Versuchen bedeutend höher gelegen.

Ein Beispiel aus den früheren Versuchen zeigt die Abb. 9. Darin ist das Urinzeitvolumen (ansteigende Säulen) und die elektrische Leitfähigkeit des Urins (obere Kurve) registriert. Die Kurven sind von rechts nach links zu lesen. Hintereinander sind in Abständen von 30 - 60 min. 0,1, 0,5 und 1,0 uE Pitressin injiziert worden. Das Ende der Injektionsperiode ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Zeitintervall der einzelnen Urinsammelperioden betrug in diesem Versuch 40 sec. Die Bedingungen der ADH-Spezifität sind hierbei erfüllt: 1.) Sowohl Urinzeitvolumen als auch Leitfähigkeit erreichen wieder ihren Aus-

Abb. 8 : Dosiswirkungsrelation von 0,1 bis 5,0 uE Vasopressin (1966
"

VERSUCHSPERIODE 1983

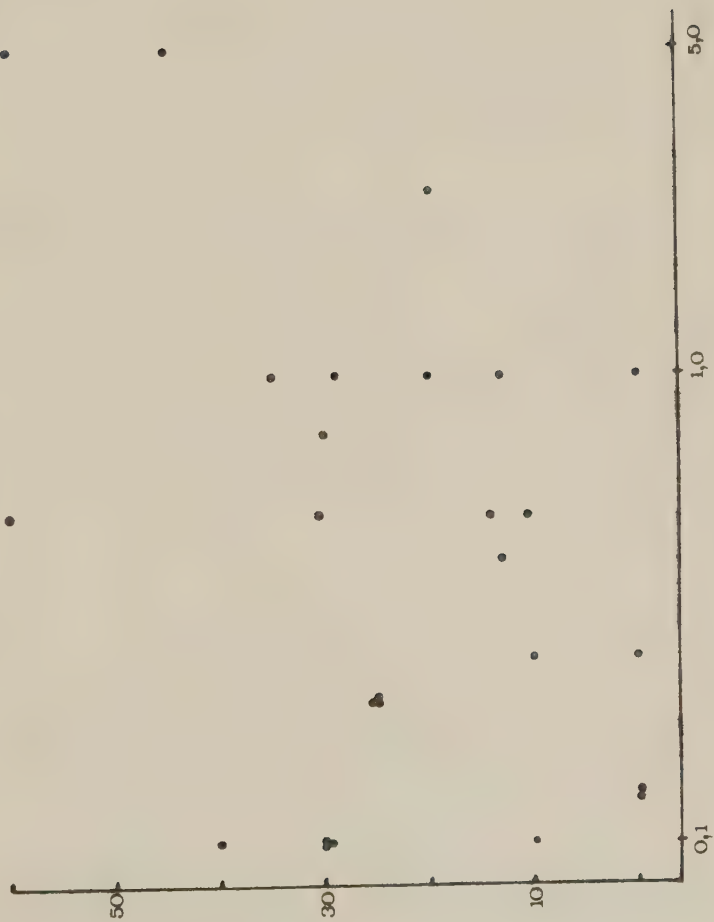


Abb. 8

Abb.9

Originalregistrierung von V_u und u nach Injektion von 0,1, 0,5 und 1,0 uE Vasopressin (Pitressin)

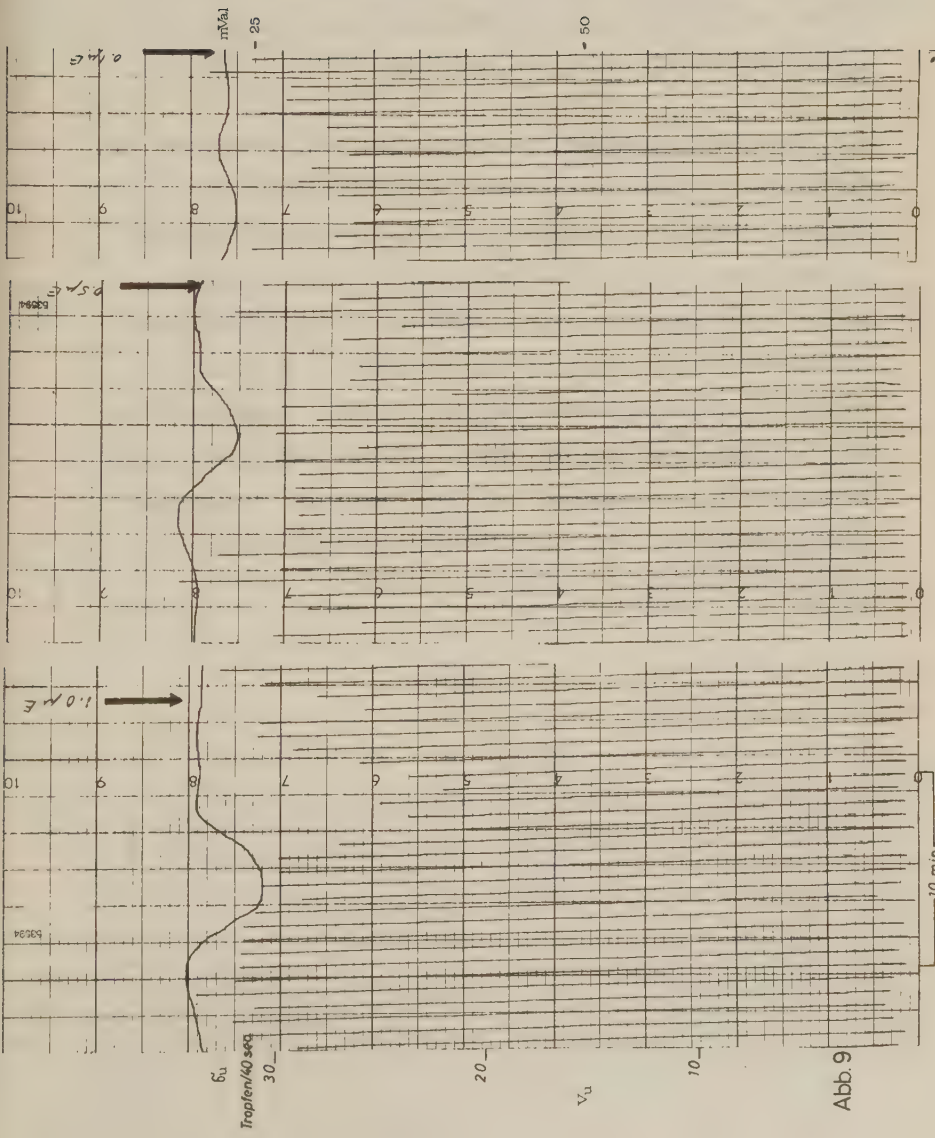


Abb. 9

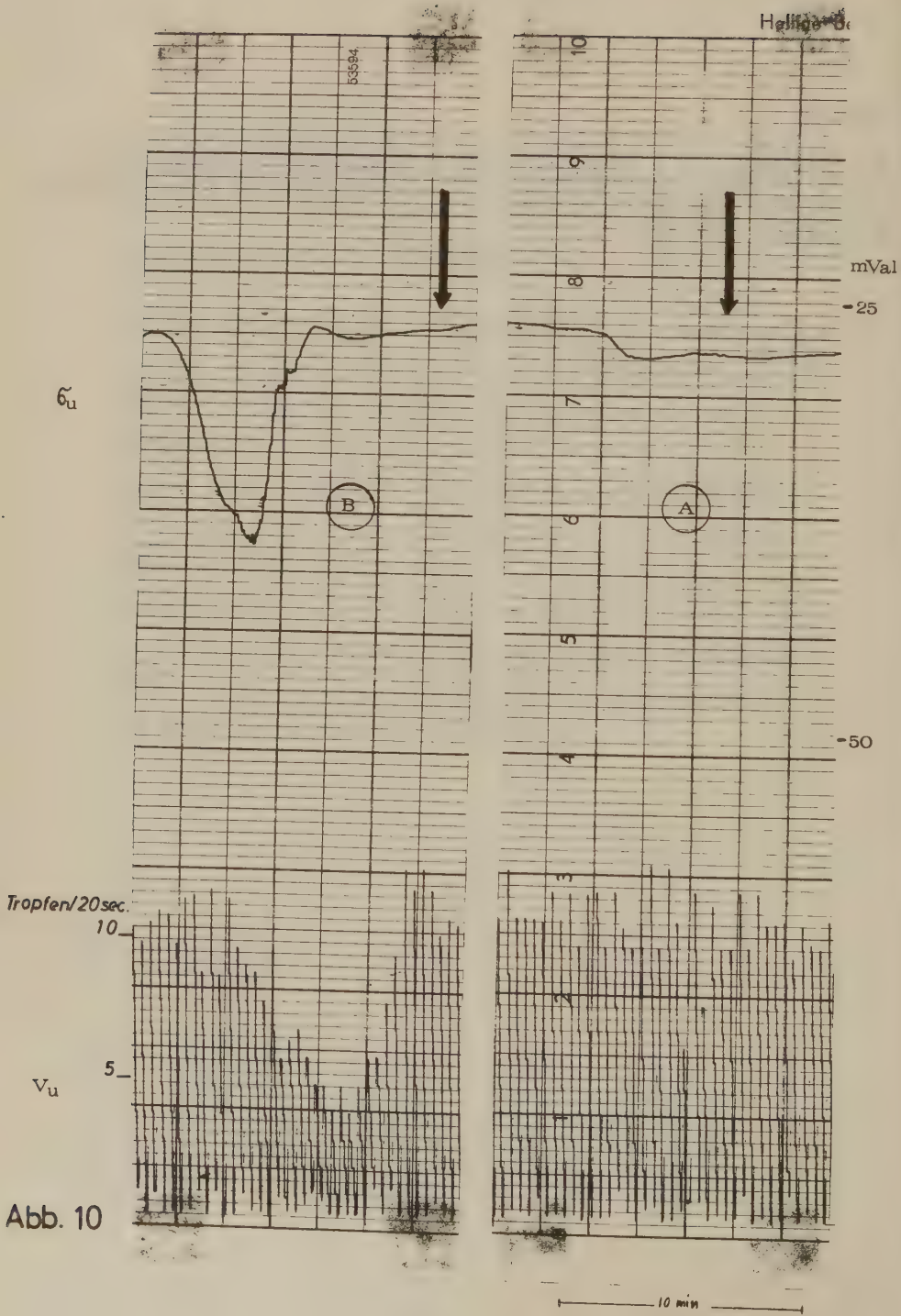
2.(Es ist eine Dosiswirkungsrelation zu erkennen. Die Reaktion auf 0,1 uE kann in diesem Fall nicht ausgewertet werden, da zu diesem Zeitpunkt die Spontanschwankung von σ_u und V_u zu groß ist.

Ein praktisches Beispiel zeigt die Abb. 10. Darin ist die Wirkung der Injektion von Serum eines Patienten mit Diabetes insipidus während eines Durstversuchs (rechts) aufgezeichnet. Links sieht man den antidiuretischen Effekt einer Injektion von Serum des gleichen Patienten, das während einer Infusion von Pitressin (5 Einheiten über 2 Stunden) abgenommen wurde. Aus den letzten 2 Beispielen sieht man, daß das Modell dieser Versuchsmethodik in Einzelfällen brauchbar ist. Die Summe der Ergebnisse zeigt jedoch, daß sie nicht ausreichend reproduzierbar und damit statistisch auswertbar sind.

Abb. 10

Die Wirkungen von 2 Serumproben eines Pat. mit Diabetes insipidus auf Vu und O u. A (während eines Durstversuches abgenommen)
B (während einer i.v. Infusion von 5 E/h Vasopressin (Pitressin^R))
abgenommen.

Einzelheiten s.Text



IV. D i s k u s s i o n

1. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse konnten die Erfolgsquote ähnlicher Versuchsanordnungen (IRMSCHER, HEINTZ, DETTELBACH) nicht bestätigen. Ebenso konnte auch die Empfindlichkeit anderer Methoden (DETTELBACH, HELLER, CZACZKES, HEINTZ, GAUER, NITSCHKE) nicht erreicht werden. Bei fast identischen Versuchsbedingungen konnten auch eigene, zeitlich unterschiedlich gelegene Untersuchungen nicht reproduziert werden. In Übereinstimmung damit konnte auch CZACZKES (VORHERR und KLEEMAN) eigene Ergebnisse nicht bestätigen. Dazu kommt noch eine Anzahl von Autoren, die zwar empfindliche Nachweisverfahren beschrieben, um sie dann offensichtlich nicht anzuwenden, da weitere Resultate nicht mehr im Schrifttum auftauchen. Im Vordergrund der Untersuchungen steht deshalb die Aufdeckung von Fehlerquellen, die eine ansich schon charakteristische Ungenauigkeit eines Bioassays vergrößern. "Individuelle" Ergebnisse werden am ehesten durch konsequente Ausscheidung möglicher Fehlerquellen verhindert. Damit sollte eine verbesserte Methodik zu erreichen sein, die dann auch allgemeine Anwendung findet.

2. Einfluß der Vorbehandlung und Auswahl der Tiere auf die Ergebnisse.

Auf die Wichtigkeit einer standardisierten Vorhydrierung der Versuchstiere ist von verschiedenen Seiten hingewiesen worden (AMES, BARATZ, BLACKMORE, CRAWFORD, CZACZKES, HEINTZ, IRMSCHER, SHARE, STEIN, THORN, VORHERR). Die aus dem Gedanken einer durch Altromin zu natriumarmen Ernährung der Ratten durchgeführten Wässerungen mit Elektrolytlösungen in den eigenen Versuchen erwiesen sich als unzweckmäßig, da sie zu großen Schwankungen des Urinvolumens führten. Dagegen bewirkte das Wassergemisch mit Glukose (Kalorienzufuhr) und Alkohol (Osmorezeptorenblockade) in Übereinstimmung mit HEINTZ große und regelmäßige Diuresen. Tiere in Wasserdiurese verhalten sich wie akut hypophysektomierte: Harnflußsteigerung durch Wegfall des antidiuretischen Vasopressineffektes. Dadurch soll eine Interferenz des exogen zugeführten Vasopressins mit endogener ADH-Sekretion vermieden werden.

Aus dem gleichen Grund werden die Tiere im allgemeinen einen Tag ohne Nahrung belassen, da nach dem Füttern der osmotische Druck des Plasmas steigt und dadurch die Neurohypophyse stimuliert wird (STACY und BROOK). Neuerdings wird jedoch über eine erhöhte ADH-Empfindlichkeit von Ratten ohne Nahrungskarenz berichtet (GUPTA, KRAMAR). In Übereinstimmung damit wurde von anderer Seite eine Sensibilitätssteigerung um das zweifache durch eine Vasopressindauerinfusion (1 uE pro Minute) mit Reduktion des Harnzeitvolumens auf die Hälfte festgestellt (FORSLING).

Ein durch verminderte Zufuhr gesteuertes Absinken der Diurese um die Hälfte ergab keine Steigerung der Empfindlichkeit. Die geringe Erhöhung der Sensibilität wurde jedoch durch eine Neigung der Rattenpräparate zu unregelmäßiger und sinkender Diurese erkauft, so daß die Spezifität der vasopressininduzierten Antidiurese fraglich ist.

Demgegenüber reagieren Ratten mit angeborenem hypothalamischem Diabetes insipidus auf antidiuretisches Hormon doppelt empfindlich als normale (VALTIN, VIERLING, JONES). Die auf Permeabilitätssteigerung der Sammelrohre beruhende Wirkung des Vasopressins ist von einem hohen Natriumkonzentrationsgradienten zwischen Interstitium und Sammelrohlumen abhängig. Chronisch hypophysektomierte Ratten können deshalb durch den herabgesetzten Konzentrationsgradienten entlang der Nierenpapille den Harn auch nach ADH-Verabreichung nicht ausreichend konzentrieren (BAUMANN). Theoretisch wäre eine weitere Empfindlichkeitssteigerung mit den Diabetes insipidus-Ratten durch Erhöhung der Osmolarität der Nierenpapille über wiederholte Vasopressinverabreichungen zu erwarten. Umgekehrt fand sich dabei jedoch sogar ein Sensibilitätsabfall von 30% (JONES, LEE).

3. Kalorienverlust als mögliche Ursache einer unspezifischen Vasopressininkretion.

Einigkeit besteht über die Alkoholanaesthesie bei allen

Autoren. Ebenso steht die Anwendung hypotoner Kochsalzlösungen nicht zur Diskussion. Während jedoch die einleitende Anaesthesie mit körperwarmem Alkoholgemisch allgemein verbreitet ist, wird über die Temperatur der Infusionslösungen nichts berichtet. Folglich wird man Zimmertemperatur (25 Grad Celsius) annehmen können. Bei einer Körpertemperatur von 37 Grad Celsius der Ratten und einer stündlichen, der Urinausscheidung entsprechenden Zufuhr von 4 ml Infusionsflüssigkeit, ergibt sich ein stündlicher Verlust von ca. 48 Kalorien/100 g Körpergewicht der Tiere. Bei Verwendung kleinerer Tiere (wie in vorliegender Versuchsanordnung) schlägt der Wärmeverlust prozentual natürlich stärker zu Buche als bei größeren Versuchstieren. Stellt man weiter die während der Narkose verminderte Wärmeproduktion des Versuchstieres in Rechnung, kann die Summe dieses Energieverlustes, zusammen mit der gegenüber dem Tierstall niedrigeren Labor-temperatur im Sinne eines Kältereizes die ADH-Sekretion stimulieren. Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete zunehmende Antidiurese und Urinkonzentration fände darin ihre Erklärung. GUZEK und Mitarbeiter wärmten die narkotisierten Tiere mit Infrarotlicht während der Versuchsdauer. Auch IRMSCHER und BREITBACH forderten eine konstante Körpertemperatur der Ratten. Sie wurde durch ein im Rektum liegendes Thermometer kontrolliert. Leider wurde jedoch nicht mitgeteilt, durch welche Maßnahmen sie konstant gehalten werden konnte.

4. Wahl der Applikationsart der Dauerinfusion und ihr Einfluß auf das Harnzeitvolumen.

Die fortlaufende Hydrierung während eines Versuchs wird entweder oral (SAWYER 58, BARATZ, HELLER, SCHRÖDER, VORHERR, KLEEMANN, SHARE, BERDE, LITTLE, PLISKA, KRAMAR, IRMSCHER, AHMED) oder intravenös (CZACZKES, HEINTZ, JONES, GAUER, NITSCHKE, GUZEK, GUPTA, SHARE) aufrecht-erhalten. Während einerseits die intravenöse Infusion zur Erreichung einer konstanten Diurese vorausgesetzt wird (NITSCHKE), kann andererseits nur bei oraler Infusion eine regelmäßige Urinausscheidung erreicht werden (VORHERR und KLEEMANN). Die Resorption intragastral zugeführter Flüssigkeit muß jedoch nicht konstant und parallel zur Verabreichung erfolgen. Unabhängig davon kann mit Magensaftsekretion gerechnet werden, da es sich (zur Erhaltung der Narkosetiefe) um eine Alkohollösung handelt. Dadurch wird jedoch eine Verminderung des Extrazellulärvolumens möglich. Diese Vorstellungen konnten auch durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden: Per-orale Alkoholfuhr während der intravenösen Dauerinfusion konnten sowohl diuretisch (entsprechend einer durch Resorption bedingten Volumenbelastung), als auch antidiuretisch (Vergrößerung des transzellulären Volumens durch Magensaftsekretion) wirken. An Sektionen fand sich wie bei NITSCHKE der Magen-Darmkanal wiederholt prall mit Flüssigkeit gefüllt.

Insgesamt wird die Flüssigkeitszufuhr bei den neueren Testverfahren intravenös aufrechterhalten. Während früher Überwiegend die Vena jugularis externa kanüliert wurde (IRMSCHER, HEINTZ, GAUER, PLISKA, BERDE, HELLER,H.) verwendet man in letzter Zeit eine Schwanzvene zur Infusion (CZACZKES, NITSCHKE, GUZEK) oder Injektion (KRAMAR, KLEEMANN). Auf jeden Fall wird damit das Operationstrauma verkleinert, wodurch die methodische Genauigkeit verbessert wird. Die in den vorliegenden Versuchen vorgenommenen Schwanzvenenpräparationen können wegen ihrer geringen Anzahl (14) nicht in Betracht gezogen werden.

5. Verringerung des Operationstraumas zur Ausschaltung unspezifischer Adiuretinsekretion.

Eine weitere operative Belastung wird durch die Tracheotomie verursacht. Da wiederholt eine Verschleimung der Atemwege mit fortschreitender Versuchsdauer beobachtet wurde, ein hohes Harnzeitvolumen jedoch nur bei freier Atmung zu erreichen ist, führte DETTELBACH die Tracheotomie in die Versuchsmethodik ein. Andere Autoren (BERDE, IRMSCHER) bestätigten eine Steigerung der Erfolgsquote der Rattenpräparationen durch Tracheotomie, sie wurde deshalb auch in den eigenen Versuchen vorgenommen. Eine bei Verschleimung stets auftretende Antidiurese konnte durch Absaugen verhindert werden. Andererseits kann jedoch

eine Verletzung des Nervus vagus bei Vornahme der Tracheotomie nicht sicher ausgeschlossen werden. Eine Vagotomie per se führt jedoch schon zu einem dreifachen Anstieg des Vasopressintiters im Blut (SHARE). Unter anderem kann auch darin die Unempfindlichkeit der eigenen Methodik begründet sein.

Das von vielen Seiten bei weiblichen Ratten geübte Einlegen eines Blasenkatheters zur Urinableitung (SCHRÖDER, VORHERR, HEINTZ, GAUER, LITTLE, AHMED) wurde wegen möglicher Blasentonusschwankungen und dadurch bedingter unregelmäßigen Diuresen von anderen Autoren abgelehnt (IRMSCHER, KLEEMANN, PLISKA, BERDE, H. HELLER). Sie führten deshalb eine suprabubische Laparotomie durch und banden einen Katheter so in die Blase, daß ein Totraum verhindert werden konnte. Die eigene Methodik schloß sich ebenfalls diesem Vorgehen an, unregelmäßige Urinausscheidungen konnten damit jedoch nicht verhindert werden. HELLER und STULC führten zur weiteren Verminderung des Operationstraumas am Versuchstag die Anlage einer Blasenfistel einige Tage vor dem Assay ein. Diesem Vorschlag wird in den neuesten Untersuchungen überwiegend gefolgt (CZACZKES, NITSCHKE, GUZEK, KRAMAR). Die Sensibilität des Testes scheint damit entscheidend verbessert worden zu sein, die untere Nachweisbarkeitsgrenze soll 5-10 μ E betragen (KRAMAR, GUZEK). Den Wert dieser Ergebnisse wird jedoch erst ihre Reproduktion durch andere Untersucher ergeben.

6. Analyse der Ursachen der Widersprüche im Schrifttum.

Biologische Bestimmungsmethoden haben im allgemeinen eine besondere Problematik. Nur angewandt, wenn physikalisch oder chemisch exakt meßbare Nachweisverfahren nicht zur Verfügung stehen, reicht ihre Genauigkeit nur zu einer annähernden Bestimmung des Materials. Unter Berücksichtigung der individuellen Biologie der Versuchstiere ergeben sich große Unsicherheitsfaktoren, Ergebnisse werden erst in einem großen Kollektiv vergleichbar. Gerade deshalb sollte eigentlich eine Standardmethodik entwickelt werden, die dann durch Überprüfung verschiedener Untersucher ihre Güte hinsichtlich der Reproduzierbarkeit beweisen könnte. Statt dessen werden ständig neue Modifikationen und "Verbesserungen" entwickelt. Zu der an sich schon charakteristischen Fehlerbreite des Bioassays addiert sich damit die durch veränderte Versuchsbedingungen verursachte Streubreite. Damit sind jedoch die Ergebnisse kaum noch vergleichbar. Die zahlreichen Widersprüche in dem Schrifttum über ADH-Nachweisverfahren finden darin ihre Erklärung.

V. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wird ein Einblick in die chemische Struktur und die Wirkungsmechanismen des antidiuretischen Hormons gegeben. Davon ausgehend werden die möglichen Nachweisverfahren des ADH im Plasma erörtert. Schließlich wird auf den heutigen Stand der Nachweismethodik eingegangen. Dabei werden zahlreiche methodische Verbesserungen beschrieben, um mit den in der Literatur auftauchenden häufigen Widersprüchen die eigenen Untersuchungen zu begründen.

Es wird der Einfluß verschiedener Vorbehandlungen der Tiere auf die Verlaufsscharakteristik des Harnzeitvolumens und der Leitfähigkeit untersucht und der optimale Zeitpunkt zur Injektion der Testlösungen aufgezeigt. Im übrigen werden die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten des Harnzeitvolumens und der Leitfähigkeit nach Verabreichung von ADH beschrieben und der Einfluß verschiedener methodischer Einzelheiten auf den Versuchsvverlauf untersucht. Dabei wird u.a. auf das unterschiedliche Ergebnis früherer Untersuchungen eingegangen, um endlich eine Interpretation der Widersprüche, hohen Streubreite und Fehlerquote der Methodik zu versuchen.

Es wird die Entwicklung einer einheitlichen Standardmethodik angeregt, die auf Grund der eigenen Untersuchungen zur Diskussion gestellt wird:

- 1.) Anlegen einer Blasenfistel 5 Tage vor dem Versuch.

- 2.) Vorhydrieren der Versuchstiere mit 2 mal 5% ihres Körpergewichts einer Glukose-Alkohollösung.
- 3.) Nach Alkoholanaesthesie Kanülierung einer Schwanzvene, Dauerinfusion und Verabreichung des Testmaterials über diese Schwanzvene.
- 4.) Zufuhr einer körperwarmen Infusionslösung und Konstanthaltung der Körpertemperatur, z.B. durch Infrarotlicht.
- 5.) Urinvolumen und Urinleitfähigkeit werden gleichzeitig registriert, damit werden die Perioden einer optimalen Wasserdiurese erkennbar.
- 6.) Die Verdünnungen des Vasopressins aus den Originalampullen werden täglich neu angesetzt.
- 7.) Verwendung eines Rattenstammes mit hypothalamischen Diabetes insipidus.

- AHMED, C.B.J., GEORGE, B.C., GONZALEZ-AUVERT, C. und DINGMAN, J.F.:
Increased plasma arginine vasopressin in
clinical adrenocortical insufficiency and its
inhibition by glucosteroids.
J.Clin.Invest. 46, 111 (1967)
- AMES, R., van DYKE, H.B.: Antidiuretic hormone in the serum
or plasma of rats.
Endocrinology 50, 350 (1952)
- ARIMURA, A. und DINGMAN, J.F.: Specific and sensitive assay
method for vasopressin and oxytocin using glass-
paper chromatography.
Nature 184, 1874 (1967)
- BARATZ, R.A. und INGRAHAM, R.C.: Renal hemodynamics and anti-
diuretic hormone release associated with volume
regulation.
Am.J.Physiol., 198:565, (1960)
- BAUMANN, J.W.: Effect of hypophysectomy on the renal concen-
trating ability of the rat.
Endocrinology 77, 496 (1965)
- BERDE, B. und CERLETTI, A.: Über die antidiuretische Wirkung
von synthetischem Lysin - Vasopressin.
Helv. Physiolog. Acta 19, 135 (1961)
- BLACKMORE, W.P. und CHESTER, H.T.: Assay of antidiuretic sub-
stance in plasma of normal and diabetes insipidus.
Endocr. 59, 493 (1965)
- BOURA, A. und DICKER, S.E.: An apparatus for the maintenance
of a constant water load and the recording of
urine flow in rats.
J. Physiol. 122, 144 (1953)
- BUCHBORN, E.: Ein quantitativer biologischer Adiuretin-
(Vasopressin-) Nachweis an der Kröte.
Z.ges.exp. Med. 125, 614 (1955)
- BURN, J.H.: Estimation of the antidiuretic potency of pituitary
(posterior lobe) extract.
Quart. J.Pharmacy 4, 517 (1931)
- CRAWFORD, J.D. and PINKHAM, B.: An assay method for anti-
diuretic hormone based on a more specific response
index.
Endocrinology 55, 521 (1954)

- CZACZKES, J.W., KLEEMAN, C.R. and KOENIG, M.: Physiologic studies of antidiuretic hormone by its direct measurement in human plasma. H.Clin.Invest. 43, 1625 (1964)
- DETTELBACH, H.R.: A method for assaying small amounts of antidiuretic substances with notes on some properties of vasopressin. Am.J. Physiol. 192, 379 (1958)
- DICKER, S.E.: The fate of the antidiuretic activity of pitressin in rats. J. Physiol. 124, 464 (1954)
- EISEN, V.D. and LEWIS, A.G.: Antidiuretic activity of human urine after surgical operations. The Lancet 267, 361 (1954)
- FORSLING, L.M., JONES, J.J. und LEE, J.: A change of sensitivity to neurohypophyseal hormones induced by their intravenous infusion in the rat. Nature 215, 433 (1967)
- FRAHM, H., SMEJKAL, E. und KRATZENSTEIN, R.: Nachweis von ADH-Aktivitäten im Serum bei hypophysektomierten Patienten mit Polyurie und Polydipsie und Kranken mit Diabetes insipidus unter dem Einfluß antidiuretisch wirksamen psychotropen Antiepileptikums (Tegretal). Verh.Dtsch.Gesellsch. Inn.Med. 75, 777 (1969)
- GINSBURG, M. and HELLER, H.: Antidiuretic activity in blood obtained from various parts of the cardiovascular system. J. Endocrinol. 9, 274 (1953)
- GAUER, O.H. and HENRY, J.P.: Circulatory basis of fluid volume control. Physiol. Rev. 43, 423 (1963)
- GUPTA, K.K.: Estimating antidiuretic hormone levels. Brit.Med.J. 185 (1968)
- GUZEK, J.W. and LESNIK, H.: The bioassay of vasopressin through its antidiuretic effect. Endocrinol. 53, 201 (1968)

- HEINTZ, R., DREWS, E.F. und BRASS, H.: Untersuchungen über den Gehalt des menschlichen Plasmas an antidiuretischem Hormon mit einer verbesserten Methode zum Hormonnachweis.
Klin. Wschr. 42, 771 (1964)
- HELLER, H. and LEDERIS, K.: Paper chromatography of small amounts of vasopressins and oxytocins.
Nature 182, 1231 (1958)
- HELLER, J. and STULC, J.: Physiology of the antidiuretic hormone. I. A simple titration method.
Physiol. Bohemoslov., 8, 558 (1959)
- IRMSCHER, K., BREITBACH, A.: Untersuchungen zur Spezifität des Adiuretin-Nachweises an der alkoholnarkotisierten, hydratisierten Ratte mit einer modifizierten Registriertechnik.
Zschr. exper. Med. 139, 286 (1956)
- JEFFERS, W.A., LIVEZEY, M.M. and AUSTIN, J.H.: A method for demonstrating an antidiuretic action of minute amounts of pitressin: statistical analysis of results.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 50, 184 (1942)
- JONES, J.J. and LEE, J.: The value of the pre-operated rat in the bioassay of vasopressin.
J. Endocrinol. 33, 329 (1965)
- KAMM, O., ALDRICH, T.B., GRATE, I.W., ROW, L.W. and BUGBEE, E.P.: The active principles of the posterior lobe of the pituitary gland.
H. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928)
- KAUTZ LAUBER, J. und EVERSOLE, W.J.: The use of the toad for bioassay of mammalian antidiuretic hormone.
Endocrinol. 64, 316 (1959)
- KLEEMAN, C.R., VORHERR, H. and HOUGHOU, M.: Sensitivity to ADH of normal and diabetes insipidus rats.
Endocrinology 80, 1168 (1967)
- KRAMAR, J., GRINNELL, E.H. and DUFF, W.M.: Observations on the diuretic activity of antidiuretic hormone.
American Journal of Medical Science 252, 53 (1966)

- LITTLE, J.B. and RADFORD, E.P.: JR. Bio-assay for anti-diuretic activity in blood of undisturbed rats.
J. Appl. Physiol. 19, 179 (1964)
- LYDTIN, H. and HAMILTON, W.F.: Effect of acute changes in left atrial pressure on urine flow in unanesthetized dogs.
Am. J. Physiol. 207, 530 (1964)
- MORAN, W.H., MILTENBERGER, F.W., SHUAYB, W.A. and ZIMMERMANN, B.: The relationship of antidiuretic hormone secretion to surgical stress.
Surgery 56, 99 (1964)
- NITSCHKE, U., ZWACKA, G. und SCHREIBER, C.: Eine für Plasmauntersuchungen geeignete Methode zum Vasopressinnachweis.
Zschr. inn. Med. 20, 747 (1965)
- PERMUTT, M.A., PARKER, C.W. and UTIGER, R.D.: Immunochemical studies with lysine vasopressin.
Endocrinology 78, 809 (1966)
- PLISKA, V. and RYCHLIK, I.: Determination of antidiuretic activity in the rat for structural analogues of the neurohypophyseal hormones.
Act. Endocr. 54, 129 (1967)
- SAWYER, W.H.: Differences in the antidiuretic responses of rats to the intravenous administration of lysine and arginine vasopressins.
Endocrinology 63, 694 (1958)
- SAWYER, W.H. and VALTIN, H.: Antidiuretic responses of rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus to vasopressin, oxytocin and nicotine.
Endocr. 80, 207 (1967)
- SCHRÖDER, R., und ROTT, D.: Über die Bestimmung und das Verhalten von ADH im menschlichen Plasma.
Klin. Wschr. 37, 1175 (1959)
- SCHRÖDER, R. und NIETMANN, E.: Untersuchungen über die Wirkungsumkehr des antid. Hormons.
Klin. Wschr. 39, 246 (1961)

- SCHWARTZ,W.B., BENNET,W., CURCLOP,S. and BARTTER,F.C.:
A syndrome of renal sodium loss and
hyponatremia probably resulting from
inappropriate secretion of antidiuretic
hormone.
Am. J.Med. 23, 529 (1957)
- SHARE,L.: Vasopressin , its bioassay and the physiological
control of its release.
Am.J.Med. 42, 701 (1967)
- SONNENBERG,H. and PEARCE,J.W.: Renal response to measured
blood volume expansion in differently
hydrated dogs.
Am. J. Physiol. 203, 344 (1962)
- STACY,B.D. and BROOK,A.H.: Antidiuretic hormone in sheep
after feeding.
J.Exp. Physiol. 50, 65 (1965)
- STEIN,M., JINKS,R. and MIRSKY,I.A.: The bioassay of pitressin
and antidiuretic substances in blood and
urine.
Endocrin. 51, 492 (1952)
- STÜRMER,E., HUGUENIN,R.L., BOISSONAS,R.A. and BERDE,B.:
Deamino ¹- phenylalanin² - arginin⁸ - vaso-
pressin, a peptide with highly selective
antidiuretic activity.
Experientia 21, 583 (1965)
- TATA,P.S. and GAUER,O.H.: Vasopressin studies in the rat.
I.A sensitive bioassay for exogenous vaso-
pressin.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 290, 279 (1966)
- TAUBERT,M.: Experimentelle und klinische Untersuchungen
über das antidiuretische Prinzip des Hypo-
physenhinterlappens (Adiuretin).
Vitamine und Hormone 8, 87 (1958)
- THORN,N.A.: A densimetric method for assay of small
amounts of antidiuretic hormone.
J.Exper.Med. 105, 575 (1957)

- VALTIN, H.: Hereditary hypothalamic diabetes insipidus in rate (Brattleboro strain).
Am.J.Med. 42, 814 (1967)
- von den VELDEN, R.: Die Nierenwirkung von Hypophysenextrakten beim Menschen.
Berl.klin.Wschr. 50, 2083 (1913)
- VERNEY, E.B.: The antidiuretic hormone and the factors which determine its release.
Proc.Roy.Soc.Med. 135, 25 (1947)
- VERNEY, E.B.: The secretion of pituitrin in mammals, as shown by perfusion of the isolated kidney of the dog.
Proc.Roy.Soc. London s.B. 99, 487 (1926)
- DU VIGNAËUD, V., RESSLER, C. and TRIPPET, S.: The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin.
J.Biol.Chem. 205, 949 (1953)
- VORHERR, H., KLEEMAN, C.R. and HOGHOUGH, M.: Factors influencing the sensitivity of rats under ethanol anaesthesia to antidiuretic hormone (ADH).
Endocrinology 82, 218 (1968)
- VORHERR, H. und FRIEDBERG, V.: Verbesserte Methode zum Adiuretin-Nachweis.
Klin. Wschr. 37, 1171 (1959)
- WAKIM, K.G.: Reassessment of the source, mode and locus of action of antidiuretic hormone.
Am.J.Med. 42, 394 (1967)
- WEINSTEIN, H., BERNE, R.M. and SACHS, H.: Vasopressin in blood: effect of hemorrhage.
Endocr. 66, 712 (1960)
- WITTE, E., REINECK, H. und GAUER, O.H.: Antidiurese und Diurese nach kleinen Tonephingaben bei der Ratte, abhängig vom oralen NaCl-Angebot.
Pflügers Arch. 274, 262 (1961)

YOSHIDA,S., MOTOHASHI,K., IBAYASHI,H. and OKINAKA,S.:
Method for the assay of antidiuretic hormone
in plasma with a note on the antidiuretic titer
of human plasma.
J.Lab. Clin.Med. 62, 279 (1963)

L e b e n s l a u f

Geboren am 8.4.1942 in Prag

1948 - 1950 Volksschule Hunderdorf

1950 - 1952 Volksschule Bogen

1952 - 1956 Oberrealschule Straubing

1956 - 1961 Gisela Oberrealschule München

Juli 1961 Abitur

Wintersemester 1961 Beginn des Medizinstudiums an der
Universität München

Februar 1962 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

April 1964 Ärztliche Vorprüfung

August 1964 Eheschließung

Januar 1965 Geburt des Sohnes Michael

April 1967 Staatsexamen der Medizin

1.9. - 30.9.1967 Medizinalassistent am Riederinstitut
der Universität München (intern)

1.10.67 - 31.7.1968 Medizinalassistent in Neukirchen Hl. Blut
(Chirurgie und Gynäkologie)

1.8.68 - 14.3.1969 Medizinalassistent an der Medizinischen
Poliklinik der Universität München

März 1969 Ehescheidung

15.3.69 - 15.9.69 Medizinalassistent in Neukirchen Hl. Blut
(Chirurgie und Gynäkologie)

September 1969 Approbation

16.9.69 - 29.2.1972 Assistent in Neukirchen Hl. Blut (Chirurgie)

Seit 1.5.1972 Wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen
Poliklinik der Universität München



